

# Proteomanalyse der Blut-Hirn-Schranke

Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigte

Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Stefan Märten

aus Groß-Gerau

Berichterstatter: Prof. Dr. H.G. Gassen  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. P.Friedl  
Tag der Einreichung: 19.11.2003  
Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2004

Darmstadt 2004

---

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Prof. Dr. H.G. Gassen angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Gassen danke ich für die Überlassung des spannenden Themas und das Interesse am Fortgang der Arbeit. Darüber hinaus für die stete Ansprechbarkeit und den Raum für wissenschaftliche und für außerfachliche Gespräche.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Martina Jäger für die kompetente und unerschütterliche Unterstützung. Daneben für Rat und Tat, so manchen Geistesblitz und nicht zuletzt für die angenehme Atmosphäre, die sich nicht nur auf das Labor beschränkte.

Frau Dr. Sabine Wolf möchte ich stellvertretend für die Esplora GmbH für den hilfreichen Beitrag, der über die Bereitstellung von Arbeitsgeräten und -utensilien herausging, bedanken. Daneben danke ich auch persönlich für die lehrreichen Doktorandensitzungen.

Patrick Pankert möchte ich für die während der Promotion entstandene Freundschaft danken, besonders für den gemeinsamen Spaß auch außerhalb der Praktikumsbetreuung.

Thomas Oppolzer danke ich für die gute Zusammenarbeit und den regen Austausch von Ideen, vor allem in der „heißen“ Endphase.

Dank geht auch an alle ehemaligen und jetzigen Mitarbeiter von Esplora für die schöne gemeinsame Zeit. Besonders bedanke ich mich bei Dominik Jordan, Tamara Hess, Petra Gruhn, Dr. André Frontzek und Monika Hofman für ihre nette und hilfsbereite Art.

Den „postdocs“, insbesondere Dr. Frank Runge, Dr. Bernhard Pelzer und Dr. Thorsten Bangsow, sei für die Vermittlung so mancher Techniken gedankt.

Allen jetzigen, und ehemaligen Mitarbeitern der Labore 608/620 sei für die gute und lockere Zusammenarbeit gedankt, besonders Simone Bartl-Zimmermann für die Unterstützung während des Grundpraktikums.

Gedankt sei auch den Herren O. Fuchs und E. Annacker für die Instandhaltung und besonders für die Konstruktion der speziellen Gerätschaften.

Herrn Prof. Galla danke ich für eine Probe des Anti-BXP21-Antikörpers.

Christian Wurm sei für die Einweisung in die Welt der konfokalen Mikroskopie gedankt.

Thorsten Jaskolla danke ich nicht zuletzt für engagiertes Arbeiten während seiner Hauptvertiefung.

Meinen Eltern danke ich, dass sie mir dieses Studium und damit diese Promotion ermöglichten und mich in allen Belangen jederzeit unterstützt haben.

Für ihr Verständnis und ihre Unterstützung danke ich von ganzem Herzen Michaela Wiegand - und für alles andere.

# Inhaltsverzeichnis

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

## ZUSAMMENFASSUNG

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Blut-Hirn-Schranke</b>	<b>2</b>
1.1.1 GLUT1	6
1.1.2 ABC-Transporter	10
<b>1.2 Lipid rafts</b>	<b>15</b>
1.2.1 Caveolin	18
1.2.2 Stofftransport und Signaltransduktion der Rafts	19
1.2.2.1 Stofftransport	20
1.2.2.2 Signaltransduktion	21
<b>1.3 Massenspektrometrie in der Proteinbiochemie</b>	<b>22</b>
1.3.1 Arten der Ionisation und Massenspektrometer	23
1.3.1.1 MALDI	23
1.3.1.2 ESI	25
1.3.2 Probenvorbereitung und Auswertung	29
1.3.3 LC-MS	32
<b>2 AUFGABENSTELLUNG</b>	<b>34</b>
<b>3 MATERIALIEN</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Geräte und Reagenzien</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Häufig verwendete Puffer und sterile Medien</b>	<b>42</b>
<b>4 METHODEN</b>	<b>43</b>
<b>4.1 Isolierung von Hirnkapillarendothelzellen</b>	<b>43</b>
<b>4.2 Zellkultur</b>	<b>45</b>
4.2.1 Beschichtung der Zellkulturgefäße mit Kollagen	46
4.2.2 Auftauen von cryokonservierten Zellen	46
4.2.3 Subkultivierung von Zellen	47
4.2.4 Kultivierung der C6-Zellen	48
4.2.5 Kultivierung der Hirnkapillarendothelzellen	49
4.2.6 Fixierung kultivierter Zellen	50
<b>4.3 Isolation von Detergens-resistenten Membranen</b>	<b>50</b>
<b>4.4 Proteinbestimmung über BCA-Test</b>	<b>52</b>
<b>4.5 Aktivitätstest Alkalische Phosphatase</b>	<b>52</b>
<b>4.6 SDS-PAGE</b>	<b>54</b>
4.6.1 Färbemethode zur Visualisierung von Proteinen in Gelen	56

4.6.1.1 Coomassie Färbung	56
4.6.1.2 Silberfärbung	56
4.6.1.3 Detektion von Proteinen durch SyproRuby-Färbung	57
<b>4.7 Immunchemische Methoden</b>	<b>58</b>
4.7.1 Dot-Blot	58
4.7.2 Western Blot	59
4.7.3 Immunchemische Färbung	60
<b>4.8 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen</b>	<b>62</b>
4.8.1 Partielle Hydrolyse im Gel durch Trypsin	62
4.8.2 Probenvorbereitung mit ZipTip™	63
4.8.3 MALDI-Analyse	64
4.8.3.1 Probenvorbereitung MALDI	64
4.8.3.2 MALDI-Messung und Identifizierung der Proben	65
4.8.4 ESI-Analyse	66
4.8.4.1 Kalibrierung des ESI-Gerätes	66
4.8.4.2 nano-HPLC-ESI	67
4.8.4.2 Aufnahme und Auswertung der Daten	69
<b>4.9 Immunhistochemie</b>	<b>70</b>
<b>4.10 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>72</b>
4.10.1 Bakterienkulturen	72
4.10.1.1 Flüssigkulturen	72
4.10.1.2 Plattenkulturen	72
4.10.1.3 Anlegen von Dauerkulturen	73
4.10.2 Transformation von DNA in Bakterien	73
4.10.2.1 Elektrokompente Zellen	73
4.10.2.2 Restriktion von DNA-Fragmenten	74
4.10.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten	74
4.10.2.4 Transformation elektrokompenter Zellen	75
4.10.3 Isolierung von Nukleinsäuren	76
4.10.3.1 Plasmidisolierung	76
4.10.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA	77
4.10.3.3 Gelelution	77
4.10.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	78
4.10.5 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)	79
4.10.5.1 Standard-PCR	79
4.10.5.2 cDNA-Synthese über Reverse Transkription-PCR	80
4.10.5.3 Real-Time-PCR	81
4.10.5.4 PCR für die Phage Display-Bank	83
4.10.6 Reinigung von PCR-Produkten	85
4.10.7 Sequenzierung von DNA	86
4.10.7.1 PCR der Sequenzierung	86
4.10.7.2 Reinigung der Seq-PCR mit paramagnetischen Partikeln	87
4.10.8 Agarose-Gelelektrophorese	88
4.10.8.1 Trennung von DNA in der Agarose-Gelelektrophorese	88
4.10.8.2 Trennung von RNA in der Agarose-Gelelektrophorese	88
<b>4.11 Phage Display</b>	<b>89</b>
4.11.1 Produktion der Phagen	90
4.12.2 Isolierung der Phagenpartikel	91
4.12.3 Selektion der Phagen gegen <i>Lipid rafts</i>	91
4.12.4 ELISA mit Phagen	92
4.12.5 Western Blot und Immunhistochemie mit Phagen	94

<b>5 ERGEBNISSE</b>	<b>96</b>
<b>5.1 Isolierung der Hirnkapillarendothelzellen</b>	<b>96</b>
<b>5.2 Kultivierung der Zellen</b>	<b>97</b>
5.2.1 Charakterisierung von P0 und P2	98
5.2.1.1 Immunfärbung mit ZO-1	98
5.2.1.2 Aktivität der Alkalischen Phosphatase	100
5.2.1.3 Bestimmung der Fläche der Zellen	101
5.2.1.4 Bestimmung der Oberfläche und des Volumens der Zellen	102
<b>5.2 Isolierung der <i>Lipid rafts</i></b>	<b>104</b>
5.2.1 <i>Cortex</i>	104
5.2.2 C6-Zellen	106
5.2.3 Kultivierte Hirnkapillarendothelzellen	108
<b>5.3 Effektivität der Reinigung von <i>Lipid rafts</i> aus kultivierten BMECs</b>	<b>109</b>
<b>5.4 Massenspektrometrische Analyse der <i>Lipid raft</i>-Fraktion</b>	<b>112</b>
5.4.1 SDS-Gel und MALDI-Analyse der LR von C6-Zellen	112
5.4.2 SDS-Gel der LR-Fraktion von Passage 0 und 2 der BMEC	114
5.4.3 GeLC-MS	116
5.4.4 Darstellung der LC-MS-Experimente	118
<b>5.5 Ergebnisse der LC-MS Analyse</b>	<b>123</b>
<b>5.6 Charakterisierung von identifizierten Proteinen</b>	<b>124</b>
5.6.1 Hypothetisches Protein FLJ20625	125
5.6.1.1 Quantifizierung des Transkriptes	125
5.6.2 Caveolin-1	129
5.6.2.2 Immunhistochemie	129
5.6.2.3 Real time PCR	131
5.6.3 GLUT1	132
5.6.3.1 Western Blot	132
5.6.3.2 Immunhistochemische Färbung der Zellen mit Anti-GLUT1	133
5.6.3.3 Quantifizierung des Transkriptes	135
5.6.4 ABCG2	136
5.6.4.1 Western Blot mit Anti-humanBCRP-Antikörper	137
5.6.4.2 Immunhistochemie	138
5.6.4.3 Quantifizierung des ABCG2-Transkriptes	140
5.7 Zusammengefasste Ergebnisse der Quantifizierung	142
<b>5.8 <i>Phagen Display</i></b>	<b>144</b>
5.8.1 Aufbau der Bank	145
5.8.2 Selektion der Phagen und Analyse	146
5.8.3 Immunfärbungen mit Phagen	148
<b>6 DISKUSSION</b>	<b>151</b>
<b>7. LITERATUR</b>	<b>169</b>
<b>ANHANG</b>	<b>187</b>

# Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding-cassette
ABTS	2',2'-Azino-bis (3-ethylbenthialozin-6-sulfonsäure)·(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchonininsäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoylphosphat-p-toulidinsalz
BHS	Blut-Hirn Schranke
BMEC	Hirnapillarendothelzellen
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
Da	Dalton
DAPI	4'-6-Diamidin-2-phenylindole Hydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ε	dekadischer Extinktionskoeffizient
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	<i>Electrospray ionisation</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
γ-GT	γ-Glutamyltranspeptidase
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LR	<i>Lipid rafts</i>
M	Molekulargewicht
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation – Time- Of-Flight</i> – spez. Flugzeitmassenspektrometer
MES	2-N-Morpholine-ethan-sulfonsäure
mod.	modifiziert
MOPS	3-N-Morpholino-propan-sulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
NBT	p-Nitrotetrazoliumblauchlorid
Page	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
pl	isoelektrischer Punkt
PSD	<i>post-source-decay</i>
RT	Raumtemperatur
Sacc.	Saccharose
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
TLCK	Tosyl-lysin-chlormethyl-keton
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
% (v/v)	Prozent (Volumen/Volumen)
% (w/v)	Prozent (Gewicht/Volumen)
% (w/w)	Prozent (Gewicht/Gewicht)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid

## Zusammenfassung

Als Sinnesorgan erfüllt das Gehirn einzigartige Funktionen. Es steuert den Organismus, ist Sitz von Gedächtnis und Bewusstsein und erlaubt es uns, aus Kenntnis der Vergangenheit eine Projektion der Zukunft zu entwickeln.

Diese Funktionen finden ihr Korrelat in einem komplexen Aufbau, der von dem Zusammenspiel von Nerven, Gliazellen und Blutkapillaren bestimmt wird. Nachdem das Humangenom entziffert wurde, versucht man z. Zt. die Identität aller im Gehirn agierender Proteine zu klären. Um diesen komplexen Ansatz zu vermeiden, haben wir uns besonders auf die Funktion der Blut-Hirn-Schranke beschränkt. Allerdings haben die Ergebnisse der letzten Jahre gezeigt, dass auch dieser Ansatz zu komplex ist.

So soll in der vorliegenden Dissertation nur ein definiertes Areal, die sog. *Lipid rafts*, ein Bereich der Membranen von Endothelzellen (BMEC), untersucht werden. Publierte Daten lassen vermuten, dass an diesen Stellen ein besonders aktiver Stofftransport abläuft.

Als Methode wurde die vergleichende Proteomanalyse von kultivierten Zellen gewählt. Letztere verlieren mit fortschreitender Kultivierungsdauer ihre Schrankeneigenschaften, was durch Aktivitätstests und Immunfärbungen gezeigt werden konnte.

Durch die Isolierung der *Lipid rafts* aus den Passagen 0 und 2 gelang es, Proteine anzureichern, die an Signal- und Transportprozessen beteiligt sind. Sie wurden zuerst mittels einer SDS-Gelelektrophorese nach Größe fraktioniert. Nach Ausschneiden der Proteinbanden und Trypsin-Hydrolyse konnten die HPLC-getrennten Fragmente mit ESI-MS massenspektrometrisch analysiert werden.

Die Identität der Proteine wurde durch Datenbankabgleich ermittelt. Näher untersucht wurden das Caveolin als Markerprotein der *Lipid raft*-Fraktion, GLUT-1 als Transportprotein für Glukose und ein von der Lokalisation her gesehen neuerer ABC-Transporter. Bioinformatische Untersuchungen zeigten bei diesem Transporter das Vorhandensein einer sog. Caveolin-Bindedomäne.

Zusätzlich erfolgte die Etablierung einer Phage-Display-Bank ausgehend von humaner DNA. Hierbei wurde über kombinatorisch synthetisierte Primer eine Diversität in der Antigen-Bindestelle von *single chain*-Antikörpern erzeugt, die schließlich auf Phagen präsentiert vorlagen. Durch eine bisher nicht beschriebene Selektion gegen die LR-Fraktion wurde die Funktionalität der Bank demonstriert. Dabei konnte ein Phage mit einem Antikörperfragment gegen das non-muscle-Myosin isoliert und die Spezifität des Fragments über Western Blot und Immunhistochemie erfolgreich gezeigt werden.

# 1 Einleitung

Das Gehirn ist als Bestandteil des Zentralen Nervensystems (ZNS) das übergeordnete Steuerorgan des Körpers. Durch Neuronen, auf zellulärer Ebene die funktionellen Träger, werden Informationen aufgenommen, verarbeitet und weitergeleitet. Aufgrund dieser komplexen Aufgaben bedarf das Gehirn einer konstanten Versorgung mit Nährstoffen und eines besonderen Schutzes vor körperfremden Substanzen (Xenobiotika).

Trotz des hohen cerebralen Blutflusses verläuft dieser Stoffaustausch zwischen Blut und Gehirn nicht ungehindert. Die Ursache dafür sind zwei physiologische Barrieren, die den Influx und Eflux von Substanzen ins und aus dem Parenchymalgewebe steuern. Zum einen ist das die sog. Blut-Hirn-Schranke (BHS) und zum anderen die sog. Blut-Plexus-Schranke (BPS).

Diese ausgefeilte Regulation des Transports bedeutet jedoch auch, dass viele Krankheitsbilder des ZNS, wie Gehirntumore, HIV-Demenz, die Alzheimer Erkrankung und das Parkinson Syndrom nicht effektiv behandelt werden können. Viele potentielle Pharmaka sind entweder nicht gehirngängig, oder erreichen nur eine geringe Wirkkonzentration im Gehirn.

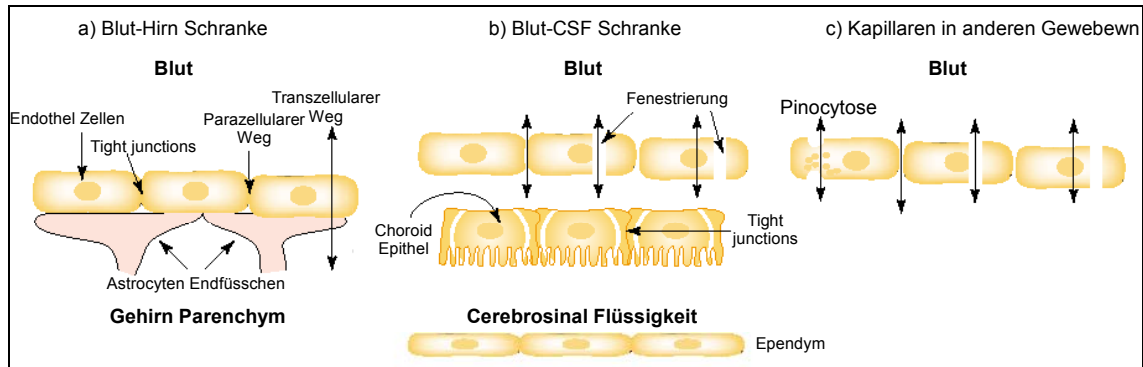
In den letzten Jahren hat die Forschung mit neuen proteinchemischen Methoden, die als *Proteomics* bezeichnet werden, viele Impulse erhalten. Unter Anwendung massenspektrometrischer Verfahren lassen sich nicht zuletzt *Drug-targets* identifizieren. Im Zusammenhang mit der Blut-Hirn-Schranke ist insbesondere das *Drug-delivery* von Interesse, um damit neue Wege für den Transport von Substanzen in das Gehirn zu finden.

Eine Reihe von Transport- und Signaltransduktionsprozesse laufen in vielen Zellen auf subzellulärer Ebene über multifunktionelle Zentren auf der Plasmamembran ab. Über die Isolation und Charakterisierung dieser Zentren aus der Blut-Hirn-Schranke mittels der Proteomanalyse können somit neue Einblicke über die Funktionsweise dieser Barriere gewonnen werden.



## 1.1 Blut-Hirn-Schranke

Bereits im Jahr 1885 wurde das Phänomen der Blut-Hirn-Schranke von Paul Ehrlich durch Injektion eines Farbstoffes in die Blutbahn von Versuchstieren entdeckt, bei dem sich als Resultat alle Organe bis auf das Gehirn gefärbt hatten.



**Abb. 1.1:** a) Schematisches Diagramm der Blut-Hirn-Schranke [BHS] und b) der Blut-Plexus-Schranke [BPS] mit den spezifischen tight junctions, die die parazelluläre Diffusion ins ZNS verhindern. Im Vergleich dazu c) der relativ freie Stoffaustausch in Endothelien anderer Gewebe [Kusuhara und Sugiyama, 2001].

Anatomisch gesehen besteht die BHS aus dem cerebralen Endothel (Abb. 1a)), welches bei Wirbeltieren das Gehirn durchzieht. Das Endothel des kontinuierlichen Typs besitzt im Gegensatz zum fenestrierten und diskontinuierlichen Endothel sehr wenig endocytotische Vesikel (Abb. 1.1c)). Daneben sind die Zellen durch *tight junctions* fest miteinander verbunden [Risau, 1995], wodurch die parazelluläre Diffusion verhindert wird. Dies bewirkt, dass die BHS gegenüber dem peripheren mikrovaskulären System 50-100 mal weniger permeabel ist [Abbott, 2002].

Die Endothelzellen bilden zusammen mit den Perizyten und den Astrozyten einen dynamisch regulierten Zellverband - die Hirnkapillare. Diese besitzt einen Durchmesser von 3-7  $\mu\text{m}$  (Abb. 1.2). Die Endothelzelle, die als einzelne Zelle den ganzen Kapillariumfang umschließt, ist von den anderen beiden Zelltypen durch die Basallamina getrennt, welche unter anderem aus Kollagen Typ IV, Laminin, Fibronectin und Heparin-sulfat besteht [Scherrmann, 2002]. Bei der Hirnkapillare bedecken die Astrozytenendfüßchen mehr als 95 % der Kapillaroberfläche [Golden und Pardridge, 1999], dies ist zwar nicht als ein großes physikalisches Hindernis anzusehen, allerdings stellen metabolische Prozesse oder Transportfunktionen eine signifikante Barriere für Substanzen dar. Zusammen mit den Perizyten bilden sie die sog. *second line of defense* [Krause, 1993].

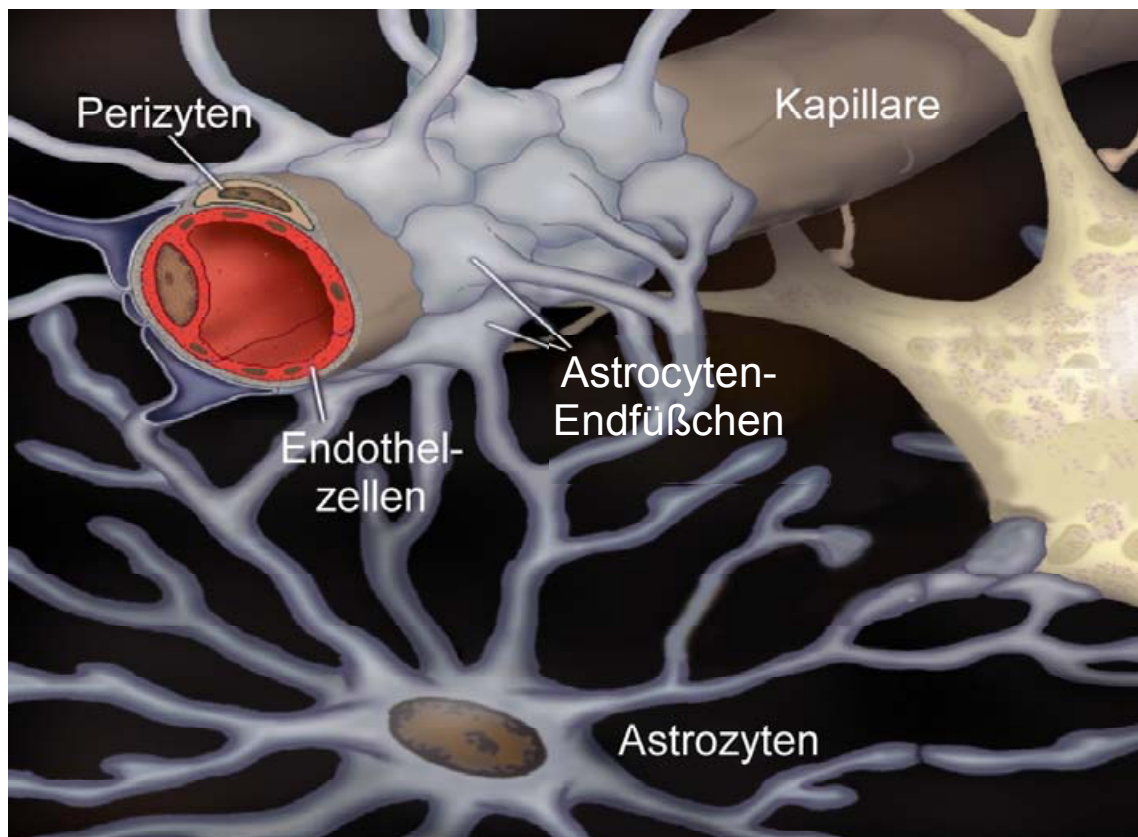


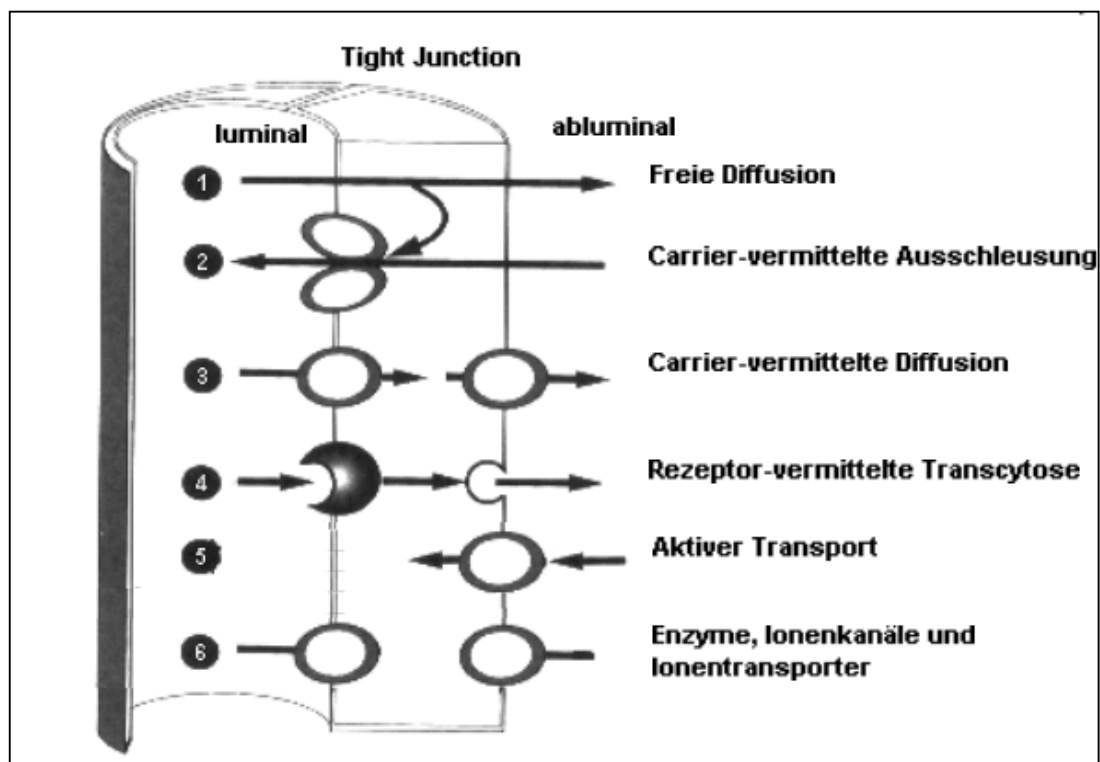
Abb. 1.2: Darstellung der Hirnkapillare, bestehend aus Endothelzelle und aufsitzenden Perizyten. Das Kapillarrohr wird von den Endfüßchen der Astrozyten umschlossen.

Eine weitere charakteristische Eigenschaft der Blut-Hirn-Schranke ist der hohe transendotheliale elektrische Widerstand (TEER), welcher *in vivo* über 1500-2000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  (Butt et al., 1990) beträgt und von der Vielzahl der *tight junctions* herrührt. Die BHS ist für anorganische Ionen nahezu undurchlässig, und die Leitfähigkeit infolgedessen gering. Aufgrund der hohen Transportaktivität (siehe unten) wird eine große Anzahl an Mitochondrien in den Hirnkapillarendothelzellen als spezifisch diskutiert. Der Aufbau der enzymatischen Barriere erfolgt durch Enzyme wie  $\gamma$ -Glutamyl-transpeptidase ( $\gamma$ -GT) und Alkalische Phosphatase, welche in anderen Endothelien vermindert oder nicht exprimiert werden. Schließlich wird noch eine Polarität zwischen luminaler und abluminaler Membran der Kapillarzellen beobachtet, die sich in der Protein- und Lipidzusammensetzung äußern [Cornford und Hyman, 1999].

Im Gegensatz zur BHS ist die Blut-Plexus-Schranke (BPS) auf den *Plexus Choroideus* beschränkt und wird ebenfalls durch *tight junctions* zusammengehaltene Epithelzellen gebildet (Abb. 1.1b)). Das Stroma ist darunter lokalisiert, welches die blutgefäßbildenden Endothelzellen ohne die festen Zell-Zell-Kontakte enthält.

Da die Austauschfläche der BHS mit etwa 10-20 m<sup>2</sup> ca. 5000 mal größer ist, als die der BCSFB, wird erstere als verantwortliche Kontrollstruktur für den Stoffaustausch des Gehirns angesehen [Demeule et al.,2002].

Aufgrund dieser effektiven Schrankenfunktion bedarf es für die Versorgung des Gehirns mit hydrophilen Substanzen wie Ionen, Glukose und Aminosäuren spezieller Transportproteine, die die Homöostase sicherstellen. Plasmamembranen sind im allgemeinen nur für hydrophobe Substanzen frei passierbar, doch wird durch metabolische Enzyme oder Eflux-Transporter in den Hirnkapillarendothelzellen deren Konzentration gleichfalls limitiert [Golden und Pollack, 2003]. In diesem Zusammenhang betrachtet, müssen in der Plasmamembran von Hirnkapillarendothelzellen Proteine exprimiert werden, die in anderen Endothelzellen wie z.B. Aortaendothel, nicht zu finden sind. Da die Zellen selbst polar sind, sind auch viele Transportproteine und Enzyme auf der luminalen (dem Blut zugewandten) und abluminalen Seite asymmetrisch verteilt. Transport- und Stoffwechselwege an der Plasmamembran der Endothelzellen lassen sich zur besseren Übersicht in sechs Gruppen einteilen (Abb. 1.3), die sich hinsichtlich ihrer Lokalisation und Funktion unterscheiden.



**Abb. 1.3:** Transportwege und Enzyme an der Blut-Hirn-Schranke; die einzelnen Gruppen sind nummeriert [Mod. aus: Tsuji, 2000].

- Gruppe 1: Sauerstoff und Kohlendioxid können frei durch die Membran diffundieren. Daneben können hydrophobe Substanzen, wie Benzol oder lipidlösliche Medikamente, aber auch Wasser die Membran ungehindert passieren. Wasser kann auch über wasserführende Kanäle, sog. Aquaporine diffundieren.
- Gruppe 2: Der Gruppe der *Carrier*-vermittelten Ausschleusung gehören Proteine mit Energieverbrauch an. Sie umfassen aber auch die multispezifischen Organische-Anionen-Transporter (s. Gruppe 3). Die Gruppe ist dafür verantwortlich, dass Xenobiotika (auch Medikamente) aus dem Gehirn ausgeschleust werden (s. 1.1.2)
- Gruppe 3: Die wichtigsten Carrier-vermittelten Transportproteine für die Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen sind die Hexosetransporter. Der prominenteste Vertreter ist Glukosetransporter 1 (GLUT1), welcher aufgrund seiner Spezifität ausführlich unter 1.1.1 betrachtet wird. Desweiteren sind für die Nährstoffversorgung des Gehirns Monocarboxy-carbonsäuren essentiell. Der Protonen-gekoppelte Transporter MCT1 (*monocarboxylic acid transporter*) ist sowohl luminal, als auch abluminal lokalisiert [Gerhart et al., 1997] und transportiert unter anderen Salicylsäure in das Gehirn. Das L-System, das den Ein- und Austritt von großen neutralen Aminosäuren wie Phenylalanin erleichtert, ist gleichmäßig auf beiden Seiten der Membran verteilt [Pardridge, 1983]. Auch Nukleinsäuren gelangen über Carrier-vermittelte Diffusion entlang des Konzentrationsgradienten ins Gehirn, da das Gehirn über keine *de novo* Nukleotid-Biosynthese verfügt [Fox und Kelley, 1978]. Aufgrund der negativen Ladung der Zellmembran bedarf vor allem der Durchgang organischer Ionen spezieller Transportsysteme. Die Familie der „Organischen Anionen Transporter“ (OAT), der zur Zeit acht Mitglieder angehören [Sekine et al., 2000], transportiert z.B. Cholate [Asaba et al., 2000],  $\beta$ -Lactame und Prostaglandine. Diese Prozesse verlaufen in und aus dem Gehirn und erfüllen physiologisch ähnliche Funktionen, wie die *Multidrug resistance*-Proteine MRP. Die OATs treten als ATP-abhängige,  $\text{Na}^+$ -abhängige und  $\text{Na}^+$ -unabhängige Transporter auf.
- Gruppe 4: Über die rezeptorvermittelte Transcytose gelangen z.B. Hormone wie Insulin [Miller et al. 1994] in das Gehirn. Der Transport führt über das „frühe Endosom“ und ist abhängig von der extrazellulären Konzentration der jeweiligen Rezeptoren [de Boer et al., 2003]. Dieser Weg soll dazu genutzt werden z.B. Peptid-mimetische Arzneimittel in das Gehirn zu schleusen [Munn, 2001]. Mit

diesem Prozess verwandt ist die Endocytose, welche vermutlich über zwei distinkte Einstülpungen, *coated* und *noncoated* Vesikel, verlaufen. Erstere enthalten das Strukturprotein Clathrin. Mit dem Transferin als Eisenrezeptor sind die *coated* Vesikel für den Eisenstoffwechsel des Gehirns essentiell. Die *noncoated*-Strukturen bestehen aus flaschenartigen Einstülpungen, die das Protein Caveolin enthalten und eine Rolle beim Cholesterin-Transport und der Signaltransduktion erfüllen sollen (s. 1.3).

- Gruppe 5: Viele Aminosäuren werden aktiv, d. h. gegen den Konzentrationsgradienten transportiert. Das Natrium-abhängige A-System transportiert kleine neutrale Aminosäuren wie Alanin in die Zelle und ist abluminal lokalisiert. Auch basische Aminosäuren gelangen über einen abluminal gelegenen Transporter in die Zelle [Sánchez del Pino et al., 1992].
- Gruppe 6: Das allgemein als BMEC-Marker anerkannte Enzym  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase [Goldstein et al., 1975] ist sowohl als luminal [Ghandour et al., 1980; Sánchez del Pino et al., 1995] als auch als abluminal [Frey et al., 1991] lokalisiert beschrieben worden. Das membrangebundene Enzym spielt eine Rolle bei der Regulation des Aminosäuretransportes über die BHS [Orlowski und Meister, 1970]. Anhand histochemischer Methoden bestimmte Vorbrodt (1990) die Alkalische Phosphatase als überwiegend luminal lokalisiert. Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPasen gelten als abluminale Proteine, wobei die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase auch beidseitig lokalisiert beschrieben wurde. Allerdings weist die luminale Seite eine geringere Affinität auf [Sánchez del Pino et al., 1995]. Desweiteren existiert noch ein  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiport auf der luminalen Membran [Ennis et al., 1996].

Die Tatsache, dass die Transporter für die BHS essentielle funktionelle Träger darstellen, wird am Beispiel von GLUT1 und der Familie der MDR-Proteine nachfolgend verdeutlicht.

### 1.1.1 GLUT1

Glukose ist die wichtigste Energiequelle der Säugetierzellen. Besonders die Neuronen des Gehirns sind unter normalen physiologischen Bedingungen absolut abhängig von der Versorgung mit Glukose. Es werden zwar auch andere Energieträger wie

Ketonkörper metabolisiert, jedoch keine Fette, die als langfristige Energiespeicher im Körper fungieren. Obwohl das Gehirn mit 1200-1400 g nur 2 % des Körpergewichtes ausmacht, benötigt es in der Ruhephase etwa 20 % der gesamten vom Körper umgesetzten Glukosemenge [Larke und Sokoloff, 1994; Cremer, 1982]. Zur Versorgung ist es, mangels ausreichender Glykogenspeicher, auf konstanten Zufluss von Nährstoffen aus dem Blut angewiesen.

Die BHS verhindert die passive Diffusion der Glukose in den interstitiellen Raum zwischen den Neuronen. Stattdessen wird die Glukose-Versorgung durch die Familie der  $\text{Na}^+$ -unabhängigen Glukosetransporter sichergestellt. Die treibende Kraft ist allein das Konzentrationsgefälle, was in einem bidirektionalen Transport resultiert.

Zur Proteinfamilie gehören fünf funktionelle Isoformen (Tab. 1.1) [Kumagai, 1999], deren Aminosäuresequenz-Homologie 39-65% beträgt [Bell et al., 1990]. Die erste klonierte Isoform, GLUT1 [Mueckler et al., 1985] kommt in hoher Dichte auf den Membranen menschlicher Erythrocyten vor, und wird in Blut-Gewebeschränken wie der Blut-Hirn-Schranke und der Blut-Placenta-Schranke exprimiert. Neben den cerebralen Kapillarendothelzellen wurde GLUT1 im Gehirn noch in Astrozyten und in Neuronen nachgewiesen [Vannucci et al., 1997].

**Tab. 1.1:** *Isoformen der  $\text{Na}^+$ -unabhängigen Glukosetransport-Familie und ihre Gewebespezifität*

<b>Isoform</b>	<b>Gewebe</b>
GLUT1	Blut-Gewebe-Schränken, Erythrocyten, Neuronen
GLUT2	Leber, Pankreas
GLUT3	Neuronen, Placenta
GLUT4	Skelettmuskel, Fettzellen, Herzmuskel,
GLUT5	Intestinales Epithelium

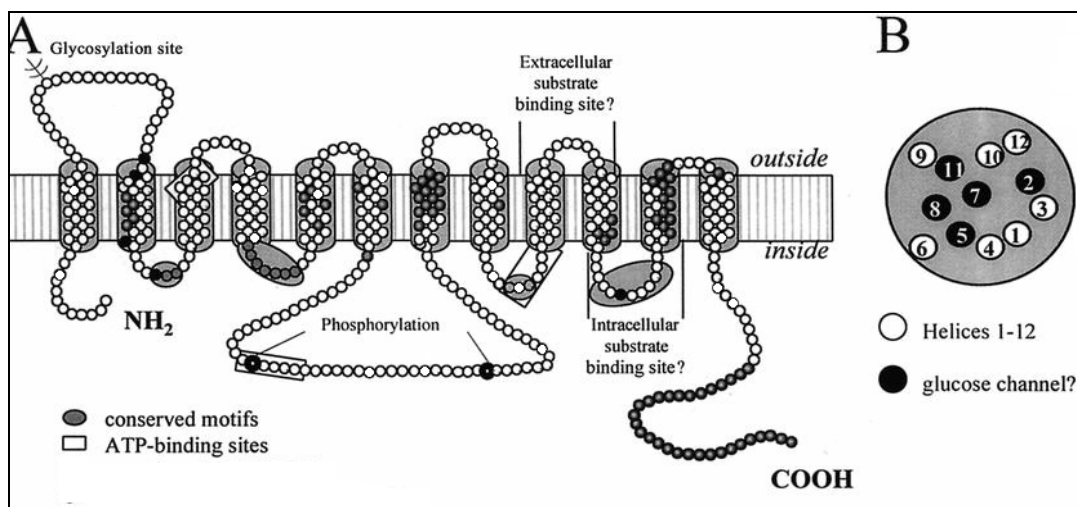
GLUT2 wird vor allem in der Leber und in  $\beta$ -Zellen des Pankreas exprimiert, wo es, gekoppelt mit der Hexokinase, zur Konstanthaltung des körpereigenen Blutzuckerspiegels beiträgt [Thorens et al., 1988].

Die Isoform GLUT3 ist der primäre Glukosetransporter der Neuronen, und zusammen mit GLUT1 der wichtigste Glukosetransporter zur Versorgung des Gehirns. Daneben wird GLUT4 bevorzugt in Skelettmuskeln und Fettzellen exprimiert [James et al., 1989;

Charron et al., 1989], wogegen GLUT5 als Fructose-Transporter im interstitiellen Epithel fungiert [Kayano et al., 1990].

Die Substratspezifität der stereoselektiven Transportfamilie ist nicht nur auf D-Glukose und ihre Analoga beschränkt, sondern umfasst auch mit niedrigerer Affinität andere D-Hexosen. Dagegen werden L-Hexosen nicht transportiert. Zusätzlich sind GLUT1 und GLUT3 für den Transport von Vitamin C in Neuronen verantwortlich. Es wird in der oxidierten Form, als metastabile dehydro-Ascorbinsäure [Agus et al., 1997], transportiert.

Durch die Analyse der Hydrophobizität der Aminosäuresequenz des integralen Membranproteins GLUT1 ergaben sich 12 Transmembranregionen mit einer einzelnen N-Glykosylierungs-Stelle in der ersten extrazellulären Schleife an Asp45 (Abb. 1.4). Die variable Glykosylierung bewirkt unterschiedliche molekulare Massen in verschiedenen Zelltypen. So ist in Präparationen aus dem Gehirn ohne mikrovaskuläres Endothel im Western Blot eine schmale Bande bei 45 kDa zu sehen, während bei isolierten Hirnkapillaren eine breite Bande bei 54 kDa beobachtet wurde [Pardridge et al., 1990].



**Abb. 1.4:** Potentielle Konformation von GLUT1 mit ATP-Binderegionen und Glykosylierungsstellen in der Membran mit 12 Transmembranregionen (A), Aufsicht mit potentiellen Membranregionen, die den Glukosekanal bilden (B). [Klepper und Voit, 2002]

Auf subzellulärer Ebene ist GLUT1 in Endothelzellen sowohl luminal als auch abluminal lokalisiert, wobei 40% des GLUT1 in der BHS von Ratten sich in intrazellulären Vesikeln befinden sollen. Außerdem beträgt das Verhältnis zwischen luminal und abluminal lokalisierten Transportern 1:4 [Farrell und Pardridge, 1991]. Jedoch wurde hierbei auch eine Spezies-bezogene Verteilung des Proteins beobachtet [Cornford und Hymann, 1999]. Beim Transport von Substanzen in die Neuronen

müssen mehrere Membranen überwunden werden. Die dem Blut zugewandte Membran des Endothels stellt dabei die kritische Schnittstelle zwischen Blut und Gehirn dar. Dies resultiert aus der Tatsache, dass die Fläche des gesamten Kapillarnetzes etwa um den Faktor 1000 kleiner, als die des Gehirns ist. Zusätzlich ist die Dichte an Transportern auf der luminalen Seite geringer, als auf der abluminalen Seite der Kapillarzellen.

Der in den cerebralen mikrovaskulären Endothelzellen lokalisierte GLUT1-Transporter wird anscheinend sowohl auf Transkriptions- als auch auf Post-Transkriptionsebenen reguliert [Vannucci et al., 1997]. Das System reagiert dabei auf den Glukosespiegel, es wird daher zu den *glucose-regulated proteins* (GRP) gezählt, und antwortet außerdem auf zellulären Stress.

Seine genomische Sequenz umfaßt 35 kb und gliedert sich in 10 Exons und 9 Introns. Die Genexpression wird durch viele Faktoren beeinflusst. So tritt in einer mit Astrozyten-konditioniertem Medium behandelten Hirnkapillarendothelzellkultur keine Änderung der GLUT1-Expression auf. Jedoch bewirkte die Behandlung mit konditioniertem Medium von Astrocyten unter Glukose-Mangel, eine höhere Glut1-Expression in den Endothelzellen [Régina et al., 2001].

Viele Medikamente wirken hemmend auf den Glukose-Transport. So wurde in Zellkulturmodellen der Rückgang der Transportaktivität bei Inkubation mit Barbituraten beobachtet. Dieser Effekt konnte bei vergleichender Behandlung mit Ethanol oder Ethylhalogeniden nicht beobachtet werden [Haspel, et al., 1999]. Daneben wird der Transport auch durch tricyclische Antidepressiva (Antagonist des Dopamin- und Serotonin-Rezeptors) gehemmt [Pinkofsky, et al., 1999].

Der Transport kann auch stimuliert werden, und zwar dann, wenn die oxidative Phosphorylierung durch Azide oder Cyanide inhibiert wird [Shetty, et al., 1993]. Die Transportstudien wurden durch Gleichgewichtsbindung mit dem starken Inhibitor Cytochalasin B ( $K_D = 1 \cdot 10^{-7}$  M) durchgeführt.

Obwohl der Transport selbst unabhängig von ATP ist, scheint er dennoch auf die zelluläre Nukleotidkonzentration zu reagieren. So ergibt die Analyse der primären Aminosäuresequenz drei Bereiche mit hoher Homologie zu Nukleotid-Bindungsstellen (Abb. 1.3). Diese Bindestellen sind wichtig für den Erhalt der Aktivität, was mit Hilfe von Mutationsstudien bestätigt werden konnte [Liu, et al., 2001].

Pathologische Änderungen der GLUT1-Expression treten unter anderem bei der Alzheimer Erkrankung auf. Die Senkung des GLUT1-Spiegels in betroffenen Regionen des Gehirns war bei weitem nicht so stark, wie die des GLUT3, dessen Expression in manchen Arealen um mehr als 50 % reduziert war [Simpson, et al., 1994].



Im Falle einer Ischämie wird der Glukose-Transport sowohl im Parenchymalgewebe als auch an der BHS hochreguliert [McCall, et al., 1996].

Ebenfalls ist beschrieben worden, dass der Transporter auch in kultivierten Zelltypen exprimiert wird, die *in vivo* kein GLUT1 exprimierten [Mueckler, 1994].

### 1.1.2 ABC-Transporter

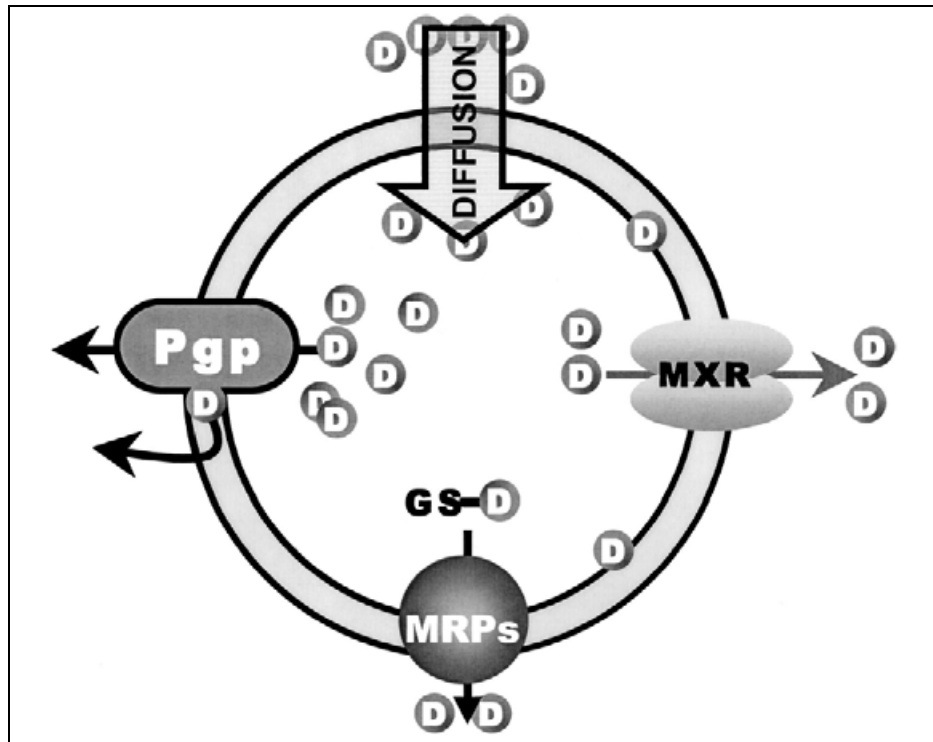
Der Durchgang eines Medikamentes über die BHS und die BPS ist notwendig, um über die notwendige Konzentration einen gewünschten pharmakologischen Effekt im Gehirn zu erreichen. Durch sog. *Efflux*-Transporter werden Substanzen aus dem Gehirn und der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) in den systemischen Kreislauf befördert. Die Klasse der ABC-Transporter trägt hauptsächlich zu diesem Prozess bei.

Von den ABC-Transportern, der größten Familie innerhalb der Transportproteine, sind im humanen Genom bisher 48 bekannte und hypothetische Proteine beschrieben worden. Diese sind, bezogen auf ihre Homologie in 7 sub-Familien (A-G) eingeteilt [Dean und Allikments, 2001]. Die Bezeichnung ABC-Transporter leitet sich von der hochkonservierten *ATP-Binding Cassette* ab. Andere Namen für die Transportfamilie sind P-Glycoprotein und *traffic ATPase*. Alle Mitglieder dieser Familie besitzen als gemeinsame Sequenz-Elemente die sog. *Walker A*- und *Walker B*-Motive und die ABC-Signatur [Klein, et al., 1999]. Während sich die Genotypen teilweise erheblich unterscheiden, sind die Phänotypen in Funktion und Struktur homolog [Golden und Pollack, 2003]. Eine Übersicht über die Nomenklatur der einzelnen Mitglieder der Familie sind im Internet <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/abc.html> zu finden.

Neben den wichtigsten Vertretern der ABC-Proteine ABCB1 („das“ P-Glycoprotein; Pgp, MDR1), ABCC1 (MRP1) und dem kürzlich identifizierten ABCG2 (*Breast cancer resistance protein*; BCRP, MXR [Doyle, 1998]) wurde diese Gruppe der Transportproteine dadurch entdeckt, dass Tumorgewebe, die mit Chemotherapeutika behandelt wurden, eine Resistenz gegen Substanzen entwickelten, denen sie vorher nicht ausgesetzt waren. Dieses Phänomen wurde als *Multi Drug Resistance* bezeichnet [Biedler und Riehm, 1970].

Der Wissensstand über das Pgp ist am größten, da dieses als erstes entdeckt wurde und sich aufgrund der klinischen Relevanz (resultierend aus der Funktion) im Fokus zahlreicher Studien befand und immer noch befindet. Es existieren vom Pgp im humanen Genom zwei Isoformen, *mdr1* und *mdr2* wobei *mdr2* nur in der Leber

exprimiert wird und keine große Rolle beim Transport von Xenobiotika spielt [Smit, et al., 1993]. Dies trifft auch für andere Mitglieder der ABC-Transporter zu, die z. B. Teil eines regulierten Ionenkanals sind, wie der *Cystische Fibrose Transmembran Regulator* (CFTR, ABCC7) [Ko und Pedersen, 2001], bei dem eine bestimmte Mutation des Gens zum Krankheitsbild der Cystischen Fibrose führt.



**Abb. 1.5:** Molekulare Träger der Multi-Drug-Resistance: Pgp, MRP und die Halbtransporter (MXR), die Substanzen – Drugs **D** aus der Zelle ausschleusen. Die hydrophoben Medikamente gelangen durch Diffusion in die Zelle und werden entweder aus der Membran (Pgp), direkt aus dem Cytosol (MXR) oder in derivatisierter Form (MRPs) transportiert. [Sauna, et al., 2001]

Die Basisstruktur von Pgp besteht aus zwei gleichen Hälften mit jeweils 6 Transmembransegmenten und je 1 ATP-Bindestelle, die mit einer *Linker*-Region verbunden sind (Abb. 1.6). Mit ca. 1300 AS ist Pgp zweimal größer als die sog. Halbtransporter, wie z. B. ABCG2. Es existieren aber auch andere Transporter mit zusätzlichen Domänen, wie MRP1. Eine Röntgenstruktur liegt bisher nicht vor, allerdings ist die Struktur eines bakteriellen Homologs teilaufgelöst [Chang und Roth, 2001]. Diese widerspricht funktionellen Studien, da letztere die ATP-Bindedomäne in der Nähe des Transportzentrums als essentiell ansehen und die Struktur dies nicht zeigte [Ambudkar, et al., 1999]. Eine Schwierigkeit bei der Durchführung einer Röntgenstrukturanalyse, bildet die Isolierung einer ausreichenden Menge Protein.

**P-glycoprotein**

**ABCG2**

**MRP1**

NBD NBD

NBD NBD

NBD NBD

TMD<sub>0</sub> L<sub>0</sub> Core

Die Regulation des Pgp untersteht einer engen Transkriptionskontrolle [Borst und Elferink, 2002]. Die post-translationale Modifikation der Glykosylierung scheint beispielsweise beim Pgp nur eine untergeordnete Rolle für die Aktivität zu spielen, wie durch Blockierung der drei Glykosylierungsstellen gezeigt wurde [Beck und Cirtain, 1982]. Dagegen scheint die Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (PKC) und Proteinkinase A viel bedeutender zu sein, doch wird auch dies in der Literatur noch diskutiert, da bisher nur Indizien, wie die Übereinstimmung der gleichzeitigen Hochregulation von PKC und Pgp vorliegen [Idriss, et al., 2000].

Beim Pgp beträgt die Transport-Stöchiometrie 1-3 Moleküle ATP pro transportiertem Substrat [Ambudkar, et al., 1999; Ambudkar, et al., 1997]. Es wird davon ausgegangen, dass lipophile oder amphiphile Substrate im Inneren der Plasmamembran von dem Protein gebunden werden und unter Hydrolyse von ATP an einer Nukleotidbindestelle durch die resultierende Konformationsänderung in den extrazellulären Raum freigesetzt werden. Unter Umständen ist die Hydrolyse eines weiteren ATPs notwendig, um den ursprünglichen Zustand wieder herzustellen

[Ramachandra, et al., 1997, Sauna, et al., 2001]. Aufgrund der ungewöhnlichen Kinetiken, die bei Untersuchungen des Transfers von Medikamenten aus der Zelle festgestellt wurden, scheinen Medikamente nicht das Cytoplasma zu erreichen, sondern werden direkt von der Plasmamembran ausgeschleust. Pgp fungiert somit als „Hydrophober Staubsauger“ [Gottesman und Pastan, 1993; Raviv, et al., 1990]. Auf der anderen Seite existiert das „Flippase-Modell“, das vorschlägt, dass Pgp als „Flippase“ agiert [Higgins und Gottesman, 1992]. Bei diesem Mechanismus werden die Substrate von der inneren Membranseite der Lipiddoppelschicht auf die äußere Seite transportiert. Dies leitet sich aus der Tatsache ab, dass das homologe MDR2 eine Phosphatidylcholin-translokase (Flippase) darstellt, welche den Transport von Phosphatidylcholin im hepatischen Gewebe gewährleistet [Ruetz und Gros, 1994, Smit, et al., 1993]. Daneben soll dieses Modell experimentelle Befunde besser bestätigen können [Ambudkar, et al., 1999].

Ein Phänomen bei den ABC-Transportern ist, dass im Gegensatz zu anderen Transportproteinen diese Klasse eine sehr weite Substratspezifität besitzt, wobei vor allem Xenobiotika und deren Konjugate aus der Zelle heraus geschleust werden. Letztere entstehen durch Entgiftungsprozesse in der Zelle, welche die Reaktionen von Substanzen mit Glutathion, Sulfaten, Glucuronsäure und Oxidantien umfassen. Die Präferenzen des P-Glycoproteins liegen im Transport von großen amphipatischen Molekülen, wie die Stoffklasse der *vinca alkaloid*e und *anthracycline*, entgegen des Konzentrationsgradienten, doch werden auch anionische Substrate transportiert. Der hydrophobe Teil dieser Stoffklassen ermöglicht das schnelle Eindringen in die Plasmamembran, jedoch wird durch den hydrophilen Teil des Moleküls das schnelle Durchtreten verhindert, wodurch dem Pgp mit einem relativ langsamen *turnover* von  $1 - 10 \text{ s}^{-1}$  dennoch genügend Zeit zum Ausschleusen der Substanz gegeben wird [Eytan, et al., 1996; Regev und Eytan, 1997; Urbatsch, et al., 2001 Ambudkar, et al., 1997].

Von den MRPs werden bevorzugt Xenobiotika-Konjugate und anorganische Moleküle aus den Zellen befördert. Die große Substratvielfalt wird vermutlich durch eine zentrale bewegliche Bindungstasche mit negativ geladenen Aminosäuren inmitten einer hydrophoben Umgebung erreicht. Durch die Flexibilität der Bindungstasche werden multiple van-der Waals Wechselwirkungen aufgebaut, die nicht die rigide Präzision von Ligand-Protein-Interaktionen in Form von Wasserstoff-Brückenbindungen benötigen [Zhelznova, et al., 2000; Vazquez-Laslop, et al., 2000].

Mittlerweile wurden Mitglieder der Genfamilie in zahlreichen nicht-pathogenen Geweben entdeckt. So findet sich P-Glycoprotein in gesundem Gewebe wie dem Intestinaltrakt, der Leber und der Niere, wo es eine pharmakologische Barriere aufbaut [Thiebaut et al., 1987]. Die Existenz des Pgp in cerebralen Kapillarendothelzellen ist

schon seit über 15 Jahren bekannt [Thiebaut et al., 1989; Cordon-Cardo et al., 1989]. Das Pgp ist auf der luminalen Seite des Hirnkapillarendothels vorhanden [Gottesman, 1993], wobei die Lokalisation auf die sog. Caveolae eingegrenzt werden konnte [Demeule, et al., 2000]. Die Identifizierung von Pgp in der Membran einer Primär-Kultur von Astrozyten wurde erst kürzlich beschrieben [Declèves, et al., 2000], doch darüber hinaus wird auch diskutiert, ob *in vivo* Pgp nur auf den Astrozytenendfüßchen exprimiert wird und nicht in den Endothelzellen [Golden und Pardridge, 1999].

Neben MDR1 wurden MRP1 [Huai-Yun, et al., 1998] und ein Homolog des BCRP [Eisenblätter und Galla, 2002] im Hirnkapillarendothel lokalisiert. Den ABC-Transportern kommt demnach eine Schlüsselrolle in der Funktion der Blut-Hirn-Schranke zu [Schinkel, 1999]. Dies wurde auch mittels einer *mdr1* (-/-)-*Knockout*-Maus gezeigt, welche eine hundertfache Sensitivität gegen ein neurotoxisches Pestizid aufwies [Ambudkar, et al., 1999].

Im Bezug auf die Blut-Hirn-Schranke ist insbesondere die Ausschleusung von Chemotherapeutika aus dem peripheren Gewebe von Gehirn-Tumoren interessant, da hier die BHS im Gegensatz zum Inneren der meisten primären Tumore noch funktionell ist. Daneben hat die Entdeckung, dass HIV-Protease-Inhibitoren Substrate von ABCB1 darstellen, das Interesse an dieser Genfamilie gesteigert, denn das Gehirn dient auf diese Weise als Reservoir für den Virus und kann den Körper dadurch kontinuierlich reinfizieren [Tardieu, 1999]. Die Konzentration der Medikamente im Gehirn wird durch Pgp gesenkt und ist folglich mit aller Wahrscheinlichkeit zu gering, um die Replikation und Reinfektion durch den Virus effektiv zu stoppen [Glynn und Yazdanian, 1998]. Dies trifft analog für viele Anti-Tumor-Präparate, die im Körper eine gewünschte Wirkung entfalten sollen, zu. Da Pgp auch in den Mukosal-Zellen des Darms vorkommt, wird auch bei oraler Verabreichung von bestimmten Medikamenten die wirksame Konzentration im Körper gesenkt [Sparreboom, et al., 1997]. So zielen kombinierte Chemotherapeutika darauf hin, dass zumindest Teile des Transportmechanismus inhibiert werden, um eine wirkungsvolle Konzentration im Gehirn zu erreichen (Fellner, et al., 2002).

Eine physiologische Bedeutung neben der Ausschleusung von Xenobiotika ist nur andeutungsweise bekannt. Die *mdr1* (-/-)-*Knockout*-Mäuse zeigten unter isolierten Bedingungen den normalen Phänotyp. Zur Zeit wird noch lebhaft über die möglichen Rollen des Pgps beim Lipid-Stoffwechsel [Borst, et al., 2000], beim Transport von Cytokinen [Raghu, et al., 1996], bei der Differenzierung von Zellen [Bunting, et al., 1999], bei der T-Cell-Aktivierung [Frank, et al., 2001] und der Apoptose [Johnstone, et al., 2000] diskutiert. Bei *abcg2* (-/-)-*Knockout*-Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese eine extrem hohe Sensitivität gegenüber Abbauprodukten des Chlorophylls

(Pheophorbide) besitzen. Dies resultierte, in manchmal tödlichen, phototoxischen Läsionen der licht-exponierten Haut [Jonker et al., 2002].

## 1.2 *Lipid rafts*

Seit über 30 Jahren bildet das Fluid-Mosaik-Modell von Singer und Nicolson (1972) das Fundament für das Verständnis der Struktur der Plasmamembran. In diesem Modell werden Membranproteine als, im Meer der Lipide, frei bewegliche Eisberge betrachtet.

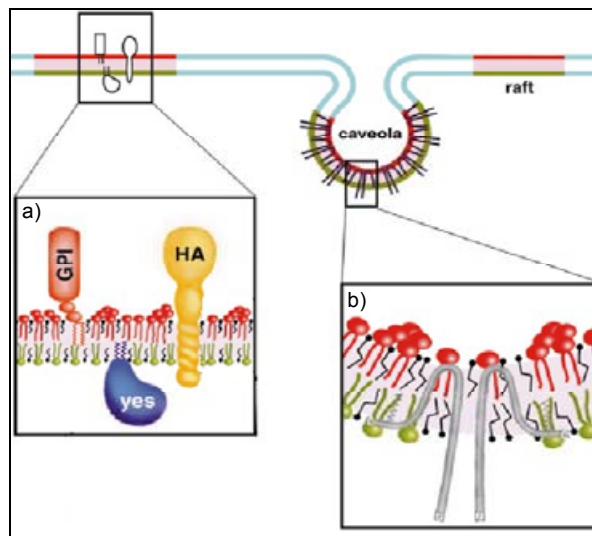
Bei Epithel- und Endothelzellen handelt es sich um polare Zellen, bei denen die Plasmamembran funktionell und morphologisch polarisiert ist (s. BHS). Nicht nur die Protein- sondern auch die Lipidzusammensetzung ist zwischen der apikalen und basolateralen Membran unterschiedlich. Bei der apikalen Membran liegt meist eine Anreicherung von Sphingolipiden vor. Ein Vermischen der Membrane, wird dabei durch die *tight junctions* verhindert. Im Laufe des letzten Jahrzehnts hat sich daher gezeigt, dass diese 2D-Lipid-Schicht nicht zufällig ist, sondern Strukturen aufweist, die wiederum die Verteilung der Proteine beeinflusst. Diese Strukturen werden als sog. *Lipid rafts* oder auch nur als *Rafts* bezeichnet.

*Lipid rafts* sind Membranregionen mit erhöhtem Cholesterin- und Sphingolipidgehalt. Die Fettsäuren der Phospholipide weisen in den *Rafts* einen höheren Sättigungsgrad, als in der umgebenden Membran auf. Dies erlaubt eine dichte Packung mit gesättigten Fettsäuren und führt zur Phasenseparierung als Folge der höheren Schmelztemperatur  $T_m$ . Aufgrund der Anwesenheit von Cholesterin, wird eine geordnete Flüssigkeitsdomäne geformt,  $l_o$ -Phase (*liquid ordered*), die weniger fluide, als die Umgebung ist. Dadurch wird auch der scharfe Schmelzpunkt des Sphingolipids diffuser [Brown und London, 2000]. Diese dichte, geordnete Packung der Lipide und die Phasenseparierung sind wahrscheinlich für eine Schlüsseleigenschaft der *Lipid rafts* verantwortlich: die Unlöslichkeit in nicht-ionischen Detergenzien [Brown et al., 1992].

Die *Rafts* sind als eine 2-Dimensionale Projektion einer „Lava-Lampe“ vorstellbar, mit verschiedenen Größen gelartiger Gebilde in konstanter Bewegung, die sich in einem fortlaufenden Prozess des Verschmelzens und Auseinandergehens befinden [Lai, 2003].

Die erste methodische Beschreibung der *Lipid rafts* demonstrierte (Abb. 1.7a)), dass Sphingolipide und Glykosylphosphatidylinositol- (GPI)-verankerte Proteine in kaltem Detergens unlöslich sind [Brown und Rose, 1992]. Daher werden sie auch als

*Detergens resistant membranes* (DRMs) bezeichnet und kommen unter anderem in Adipocyten, Epithel- und Endothelzellen vor.



**Abb. 1.7:** Schematische Darstellung des Aufbaus von a) Rafts und b) Caveolae in der Plasmamembran. Beide Strukturen weisen einen hohen Gehalt an Cholesterin und Sphingolipiden auf. Daher reichern sich z.B. GPI-verankerte Proteine und acylierte Proteine in Rafts a) an. Caveolae werden durch die Haarnadelstruktur von Caveolin b) geformt [mod. nach Simons und Ikonen, 1997].

Caveolae sind kleine flaschenartige Einstülpungen in der Plasmamembran und können als spezielle Form der *Rafts* angesehen werden (Abb. 1.7b)). Sie sind bisher die einzigen morphologisch identifizierbaren Typen von Lipid-Domänen und sind seit fünfzig Jahren bekannt [Palade, 1953; Yamada, 1955]. Neben anderen Zelltypen finden sich Caveolae auch in Endothelzellen. Hierbei ist die Dichte im kontinuierlichen Endothel mit etwa 85 vesikulären Öffnungen pro  $\mu\text{m}^2$  5-10 mal höher, als im fenestrierten Endothel [Simionescu, et al., 1974; Simionescu, et al., 2002]. Die Strukturen haben etwa einen Durchmesser von 50-200 nm [Pike, 2003], was etwa 3.500-10.000 Sphingolipidmoleküle und 10-100 Proteine in dieser Struktur beinhalten würde [Simons und Toomre, 2000].

Aufgrund der meist uneinheitlichen Bezeichnung der verschiedenen Domänen soll in Tabelle 1.2 nach Vorschlägen von Simons und Toomre (2000) versucht werden, eine klare Differenzierung zu erreichen.

Die am häufigsten angewendete Methode zur Isolierung der DRM ist der Aufschluss von Zellen in 1% Triton X-100-Puffer. Das Homogenat wird anschließend auf einen Saccharose-Gradienten aufgetragen, wobei sich die DRM im oberen Abschnitt des Gradienten anreichern. Daneben können auch andere Detergenzien oder andere Gradienten, wie das sog. Opti-Prep™ zur Anwendung kommen, wobei die

Zusammensetzungen je nach Zielsetzung variiert werden [Brown und Rose, 1992; Ropper, et al., 2000, Drevot, et al., 2002; Ilangumaran, et al., 1999].

**Tab. 1.2:** *Begriffliche und inhaltliche Unterscheidung zwischen Rafts, DRM und Caveolae*

	<b><i>Rafts</i></b>	<b><i>DRMs</i></b>	<b><i>Caveolae</i></b>
<b>Bestandteile</b>	Glycosphingolipide Cholesterin GPI-Proteine Acylierte Proteine Transmembran Proteine	<i>Rafts</i> die unlöslich nach Behandlung mit nicht- ionischem Detergens bei 4°C verbleiben	Caveoline Ansonsten ähnlich wie <i>Rafts</i>
<b>Eigenschaften</b>	50-200 nm Durchmesser geordnete Flüssigkeitsdomäne	im Schwimmen bei als Dichte im Gradienten	nd. Einstülpungen auf der Saccharose- Zelloberfläche
<b>Sonstiges</b>	Nativ und nur in lebenden Zellen detektierbar	Nicht-nativ, variable Zusammensetzung je nach Detergens und Zelltyp	Unterkategorie der <i>Rafts</i>

Die *Rafts* können auch ohne zuhilfenahme von Detergenzien gewonnen werden, wenn der Aufschluss nur in Natriumcarbonat (pH 11) durchgeführt oder mit Ultraschall aufgeschlossen wird. Bei allen Methoden können allerdings Anreicherungen unterschiedlich stark auftreten. Dass es sich bei den *Rafts* nicht nur um ein biophysikalisches Artefakt handelt, welches aus der Isolierung resultiert, sondern um einen nativen Zustand, wurde auch durch hoch auflösende Immunfluoreszenzstudien von lebenden Zellen durch Verwendung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) zur Untersuchung der Entfernung einzelner GPI-Proteine gezeigt werden [Varma und Mayor, 1998].

Mit der Entdeckung des Caveolins als Markerprotein der Fraktion ist die Erforschung dieser Membrandomänen als DRM erheblich beschleunigt worden [Mirre, et al., 1996]. Doch gibt es auch Zellen, wie Lymphocyten und Neuronen, die wenig oder kein Caveolin exprimieren [Simons und Toomre, 2000]. Daher werden mittlerweile andere Markerproteine wie die sog. Flotilline zusätzlich oder alternativ herangezogen.

Die Bedeutung der *Rafts* wird dadurch unterstrichen, dass sie mit mehreren Krankheiten in Verbindung gebracht werden. So haben sowohl das Prion-, das HIV-1- und das Alzheimer-Protein (A $\beta$ ) ein gemeinsames Sphingolipid-bindendes Motiv [Mahfoud, et al., 2001]. Dadurch wird den *Rafts* beispielsweise eine entscheidende



Rolle beim Durchtritt des HIV-1 durch die BHS zugeschrieben [Liu, et al., 2002]. Doch wird die genaue Rolle der *Rafts* im Zusammenhang mit verschiedenen Stadien dieser Erkrankungen noch immer diskutiert.

### 1.2.1 Caveolin

Neben der  $\Omega$ -förmigen Einstülpung heben sich Caveolae (von *cave* = Höhle) von den Rafts durch die Anwesenheit der Proteinfamilie der Caveoline ab, die auch verantwortlich für die Struktur der Caveolae zu sein scheinen [Murata, et al., 1995; Fra, et al., 1995; Le, et al., 2002].

Caveoline stellen eine Familie integraler Membranproteine dar, welche eine molekulare Masse von 21 –25 kDa aufweisen. Zur Zeit sind bei Säugern 3 Gene bekannt, wobei Caveolin-1 und Caveolin-2 ubiquitär exprimiert werden, und Caveolin-3 muskelspezifisch zu sein scheint. Von Caveolin-1 und Caveolin-2 sind 2 bzw. 3 Isoformen bekannt, die durch alternierende Initiation generiert werden [Bilderback, et al., 1999].

Bezüglich der Struktur ist bekannt, dass eine 33 AS lange Domäne vermutlich in die Membran hineinragt, wobei sich sowohl N- als auch C-Terminus im Cytosol befinden [Kurzchalia, et al., 1992]. Caveolin-1 wird von der Phosphokinase-C $\alpha$  entweder an Ser oder Thr phosphoryliert. Daneben wird vorzugsweise Tyr 14 von c-src oder anderen „Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen“ phosphoryliert [Stan, 2002]. Caveolin-1 und -3 werden posttranslational an 3 Cysteinen am C-Terminus über einen Thioester palmitoyliert [Parade und Fox, 2001]. Im Endothel verläuft die Palmitoylierung posttranslational und scheinbar irreversibel, was als wichtiger Unterschied zu anderen acylierten Proteinen gilt, wo die Modifikation reversibel und regulierbar ist [Dunphy und Linder, 1998; Parat und Fox, 2001; Resh, 1999]. Daher wurde vorgeschlagen, dass die Palmitoylierung die Membran-Assoziierung durch die hydrophoben Domänen erhöhen soll und diese Palmitoylierung erst die Bindung von Cholesterin ermöglicht [Machleidt, et al., 2000; Song, et al., 1997].

Etwa 90 % des Caveolin-1 sind unter normalen Bedingungen in der Plasmamembran lokalisiert [Rothberg, et al., 1992], daneben befinden sich Teile im ER und im Golgi. Es wird davon ausgegangen, dass dies die Wanderung von Caveolin und Caveolae zwischen Plasmamembran und intrazellulären Kompartimenten widerspiegelt.

Sowohl die Lokalisation, als auch die mRNA-Menge von Caveolin-1 ist vom zellulären Cholesterin-Spiegel abhängig. So wandert Caveolin bei der selektiven Oxidation von

Cholesterin über das ER schließlich zum Golgi. Bei Wiederanstieg der Cholesterinkonzentration geht es zurück in die Caveolae [Smart, et al., 1996; Smart, et al., 1994]. Bei hoher Konzentration des Cholesterins in der Zelle wird gleichzeitig die Translation des Caveolin-Gens gesteigert [Fielding und Fielding, 1997]. Es fungiert somit als shuttle-Protein im biosynthetischen Transport von Cholesterin vom ER zur Plasmamembran.

Doch gibt es auch neuere Befunde [van Deurs, et al., 2003], die beschreiben, dass wenn das Caveolin in die Caveolae transportiert wird, nur noch 5-20% davon mobil sind. Es wird dabei vermutlich über Filamin an Aktin und damit im Cytoskelet verankert. So weit bekannt, umfasst die Funktionalität des Caveolin-1 noch weitere Bereiche. Zum einen bildet es als Homooligomer bzw. Heterooligomer mit Caveolin-2 die strukturelle Komponente der Caveolae. Daneben dient es als Gerüstprotein für zahlreiche Signalproteine, die in sich an der cytoplasmatischen Seite von Caveolae anreichern [Smar, et al., 1999] (s. 1.2.2).

Aus dieser Tatsache bildet sich die verbreitete Hypothese, dass Caveolae und *Rafts* Plattformen für Signaltransduktion und Stofftransport darstellen und eine Schlüsselrolle dabei ausführen. Einen Fortschritt in der Beantwortung der Frage, ob Caveolin einen Beitrag bei der Signaltransduktion spielt, wurde dadurch erlangt, dass mögliche Partner ein Bindungsmotiv  $\phi\text{xxxx}\phi\text{xx } \phi$  oder  $\phi\text{x}\phi\text{xxxx}\phi$  bzw.  $\phi\text{x}\phi\text{xxxx}\phi\text{xx}\phi$  besitzen, wobei  $\phi$  für Phe, Tyr oder Trp und x für eine beliebige Aminosäure steht [Fielding und Fielding, 2003].

Trotz der unter 1.2.2 dargestellten Schlüsselfunktionen der *Rafts* sind Caveolin-1-Knockout-Mäuse vital und fruchtbar. Auch der Cholesterin-Spiegel im Blut ist trotz der Rolle beim Cholesterin-Stoffwechsel normal [Drab et al., 2001]. Allerdings ist das Kardiovaskuläre System, in Form von Abnormalitäten im Herzen, und in der Lunge betroffen. Bei Knockout-Mäusen, bei denen Caveolin-1 und -3 defekt sind, kommt es im Blut zur erhöhten Konzentration an freien Fettsäuren und Triglyceriden [Razani, et al., 2002]. Dies deutet auf ein Eingreifen des Caveolins bei der Fettaufnahme in Adipocyten hin. Jedoch konnte dieses neuentdeckte Phänomen bisher noch nicht geklärt werden.

### 1.2.2 Stofftransport und Signaltransduktion der *Rafts*

Dass die *Rafts* als Gerüst bei Stofftransport und Signaltransduktion fungieren, ist durch zahlreiche experimentelle Studien gezeigt worden. Allerdings konnte diese Funktion

erst durch die Verwendung unterschiedlichster Methoden untermauert werden. Diese Methoden sind unter anderem FRET, Antikörpermarkierungen, GFP-Fusionsproteine und Aktivitätsstudien mit und ohne methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (entfernt Cholesterin). In einzelnen Fällen wird die Funktion allein aus der Tatsache abgeleitet, dass beispielsweise Proteine, die an Signalwegen beteiligt sind, in der DRM co-fraktionieren.

### 1.2.2.1 Stofftransport

Trotz der Tatsache, dass Caveolin-Knockout-Mäuse keine lethalen Defekte aufweisen, spricht vieles für die wichtige Rolle der Caveolae bei Transportprozessen. So ist vor allem die hohe Dichte der Caveolae im kontinuierlichen Endothel sehr auffällig.

Weitere experimentelle Befunde stützen diese Argumentation. So wird beispielsweise das Cholera-toxin über die Caveolae internalisiert [Parton, et al., 1994].

Auch Folsäuren werden über einen mit Potocytose bezeichneten Vorgang in die Zelle befördert [Anderson, et al., 1992]. Dabei werden kleine Moleküle, die unabhängig von der Endocytose sind, an einen Rezeptor in den Caveolae gebunden. Anschließend stülpt sich letztere ein und verschließt sich. Aus diesem versiegelten Raum kann das Molekül nun relativ einfach in die Zelle über die Plasmamembran wandern. Gleiches wird für die *high-density lipoprotein* Teilchen (HDL) vermutet, da sich die HDL-Rezeptoren in den Caveolae anreichern [Babitt, et al., 1997]. Als bewiesen angesehen wird, dass die Einstülpungen bei dem Albumin-Transport eine entscheidende Beteiligung ausüben. So wird in der Lunge von Mäusen das Albumin nicht transportiert, wenn Caveolin-1 deletiert wurde [Schubert, et al., 2001].

Sogar ganze Viruspartikel wie der SV40 Virus dringen über einen Caveolae-vermittelten Weg in die Zelle ein [Arni, et al., 1998]. Gleiches wird auch für bestimmte *E.coli*-Stämme diskutiert [Schroeder, et al., 1998].

In Endothelzellen ist besonders der transendotheliale Transport interessant (Transcytose). Hierbei wird vermutet, dass sich die Caveolae abschnüren und als freie Vesikel zur gegenüberliegenden Plasmamembran diffundieren und dadurch auch Stoffe über das Endothel schleusen. In Endothelzellen wurde in diesem Zusammenhang Caveolin-1 auch im Cytosol bei der Beteiligung zur Bildung von sog. „*endothelial transcytotic machinery complexes*“ (ETMC) durch die Co-Präzipitation mit dem *N*-Ethylmaleimid-sensitiven Faktor gefunden, bei denen unter anderem auch die Actin-bindenden Proteine Dynamin und Annexin II beteiligt sind [Predescu, et al., 2001]. Jedoch ist die Anzahl der freien Vesikel sehr gering, wobei die Transzytose über die Endothelzellen nur kurzlebige Vesikel erfordern, da sie sehr flach sind. Es wird

daher sogar die Bildung von Kanälen aus der Caveolae-Struktur heraus beschrieben [Simionescu, et al., 2002].

### 1.2.2.2 Signaltransduktion

Erst durch die Koordinierung der unterschiedlichen Organisationsebenen durch aufwendige chemische Signalsysteme entsteht aus einem „Zellhaufen“ ein Organismus. Ein Weg für die Weiterleitung von Signalen verläuft durch Binden von Signalstoffen wie beispielsweise Adrenalin an Zelloberflächen-Rezeptoren. Diese leiten das Signal über die resultierende Konformationsänderung an die sog. G-Proteine weiter. Das G-Protein setzt nach der Aktivierung durch GTP den *second messenger* cAMP ausgehend von ATP frei, wodurch eine Signalkaskade ausgelöst wird. Dies resultiert meist in der Regulation diverser Proteine durch Kinasen über Phosphorylierung /Dephosphorylierung.

Die Rolle der *Rafts* wird am Beispiel von zwei Signalsystemen diskutiert: den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und den G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren (GPCR).

Im einfachsten Falle können die *Rafts* als Signal-Plattformen betrachtet werden, die dazu dienen, die entsprechenden Komponenten zusammenzubringen und ihre Wechselwirkung und damit auch die Signalweiterleitung zu unterstützen.

Im anderen Fall sind die komplementären Komponenten eines Signalweges unter basalen Bedingungen in *Rafts* unterschiedlicher Zusammensetzung getrennt. Durch einen Stimulus fusionieren diese. Alternativ kann ein Rezeptor durch Bindung aktiviert werden, seine Affinität zu den *Rafts* erhöhen und dadurch sein Signal weitergeben. Durch die Lipid-Domänen sind somit Proteine in Kompartimenten lokalisiert, die ansonsten frei interagieren könnten.

Auf Ebene der *Rafts* gelten die Rezeptor- und Nicht-Rezeptor-Tyrosin Kinasen (PTK) als Markerproteine der Caveolae [Anderson, 1998]. Ein Substrat der PTK ist Caveolin. Beispielsweise wird durch Insulin die Phosphorylierung des Caveolins stimuliert [Mastick, et al., 1995]. Zu den PTKs werden darüber hinaus viele Rezeptoren für Wachstumsfaktoren gezählt und dementsprechend reguliert [Pike, 2003].

Zu den Nicht-Rezeptor-Kinasen gehört die Familie src-Kinasen. Diese interagieren unter anderem mit GPI-Proteinen wie  $GFR\alpha$ , welcher eine Bedeutung bei der Differenzierung hat [Saarma, 2000]. Der Signalmechanismus, der von den *glial-cell-derived neurotrophic factor* (GDNF) ausgelöst wird, läuft nach dem oben beschriebenen Schema ab, dass unter basalen Bedingungen die einzelnen Proteine nicht in den *Rafts* co-lokalisiert sind. Durch Auflösen der *Rafts* mit Methyl- $\beta$ -

Cyclodextrin, welches Cholesterin extrahiert, wird der Signalweg zwar nicht unterbunden, aber behindert [Liu, et al., 1997].

Die Bedeutung der Caveolin-Binde-Domäne und die Wechselwirkung mit Signalmolekülen wurde durch Mutationen in der Binde-Sequenz von endothelialen NO-Synthase (eNOS) gezeigt. NO ist ein wichtiger Botenstoff der über kurze Distanzen (benachbarte Zellen) wirkt. So ist die inhibierende Wirkung des Caveolins bei der Bindung an eNOS bei den Mutanten nicht mehr vorhanden [Garcia-Cardena, 1997].

Eine Reihe von GPCRs wurden als in den *Rafts* angereichert beschrieben. So z.B. die  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenogen Rezeptoren, der Endothelin-Rezeptor [Feron, et al., 1997] und Rhodopsin [Seno, et al., 2001]. Genauso bedeutend ist die Lokalisation der G-Proteine selbst in den Lipid-Domänen. Dies resultiert vermutlich aus der Acylierung der  $\alpha$ -Untereinheiten der Proteine [Moffett, et al., 2000]

### 1.3 Massenspektrometrie in der Proteinbiochemie

Die Massenspektrometrie hat ihre Anfänge in den ersten Jahrzehnten des letzten Jahrhunderts gefunden. Sie ist eine analytische Technik, mit der es möglich ist, die genaue Masse eines Moleküls mit hoher Sensitivität zu bestimmen. Den ersten Siegeszug trat diese Methode um 1960 in der organischen Chemie mit der Bestimmung der relativen Masse und des Fragmentierungsmusters kleinerer Moleküle an. Bis zu den achtziger Jahren war sie vornehmlich auf die Untersuchung niedermolekularer und flüchtiger und demnach leicht ionisierbaren Substanzen begrenzt.

Vor allem die Sensitivität macht die Massenspektrometrie zu einem Werkzeug in der biochemischen Forschung. Doch erst ab Mitte der 80er Jahre konnte die Massenspektrometrie für die Untersuchung von Proteinen und Peptiden angewendet werden. Vorher war es mit keiner Technik gelungen, die polaren und fragilen Makromoleküle ionisiert in die Gasphase zu überführen. Mit der Entwicklung der *matrix-assisted laser desorption ionization* (MALDI) durch Karas und Hillenkamp (1988) und der *electrospray ionization* (ESI) durch Fenn *et al.* (1989) gelang es schließlich, die Massen von biochemischen Polymeren zu bestimmen.

Durch Verwendung dieser „sanften“ Ionisation wird die Fragmentierung aufgrund der thermischen Zersetzung der Analytmoleküle durch andere Quellen wie Elektronenstoß-Ionisation (EI), Chemische Ionisation (CI) und *Fast-Atom Bombardment* (FAB), vermieden.

Durch die biochemischen Applikation der Massenspektrometrie wurden in der Proteomanalyse große Fortschritte erzielt. In diesem Arbeitsgebiet werden Proteine, d.h. die Produkte der Gene, untersucht. Aufgrund ihrer Sensitivität entwickelte sich die Massenspektrometrie zur Schlüsseltechnologie in diesem Forschungsbereich.

Um biologische und pharmakologische Fragestellungen zu beantworten, findet die Analysetechnik dabei hauptsächlich in drei Forschungszweigen Anwendung. Zum einen in der Charakterisierung rekombinanter Proteine oder anderen biologischen Makromolekülen. Des weiteren zur Detektierung von post-translationalen Modifikationen und nicht zuletzt zur Identifizierung von Proteinen.

### 1.3.1 Arten der Ionisation und Massenspektrometer

Ein Massenspektrometer besteht prinzipiell aus drei Komponenten. Dies ist zum einen die Ionenquelle, die aus Molekülen Ionen in der Gasphase erzeugt. Die gebildeten Ionen werden im zweiten Teil, dem Massenanalysator, nach ihrem Masse-Ladungs-Quotienten ( $m/z$ ) getrennt und treffen schließlich auf den dritten Bestandteil eines Massenspektrometers, den Detektor.

#### 1.3.1.1 MALDI

Bei der MALDI-Methode werden die Analytmoleküle mit einem großen Überschuss an aromatischer Säure, die im Gegensatz zu den Peptiden leicht ionisierbar sind, als sog. Matrix-Material auf einem Metallträger aufgetragen und getrocknet. Als Matrix finden meist  $\alpha$ -Cyano-4-zimtsäure und 2,5-Dihydroxybenzoesäure Anwendung. Die Analytmoleküle reichern sich in den Matrixkristallen an, was anhand der Einlagerung von Indikator-Substanzen gezeigt wurde [Krüger, et al., 2001].

Die co-kristalline Schicht wird im Vakuum mit einem kurzen Laserpuls (3-15 ns), dessen Wellenlänge sich im Absorptionsmaximum der Säuren (337 nm) befindet, angeregt. Sowohl Analyt als auch Matrix werden aus der co-kristallinen Schicht herausgeschleudert, wobei Protonen der Matrixmoleküle auf die Analytmoleküle übertragen werden (Abb. 1.8.A).

In Kombination mit MALDI wird meist ein Flugzeitanalysator (*time of flight* - TOF) verwendet. Hierbei werden die gebildeten Ionen zunächst durch eine angelegte Spannung beschleunigt und schließlich die Zeit im feldfreien Vakuum bestimmt, die bis

zu dem Eintreffen am Detektor vergeht. Wenn aufgrund der Energieerhaltung die kinetische Energie der jeweiligen Ionen mit der elektrischen gleichgesetzt wird, lässt sich daraus das  $m/z$ -Verhältnis ermitteln. Die kinetische Energie ergibt sich hierbei aus der Flugzeit, welche in der Größenordnung von  $\mu s$  liegt. In Abb. 1.8.B ist der Aufbau einer solchen Apparatur schematisch wiedergegeben. Dabei wird durch die Verwendung eines Reflektors die Auflösung erhöht. Über den Reflektor werden die Analyt-Ionen abgebremst und nachfolgend wieder beschleunigt, wodurch sie fokussiert werden.

Moderne Geräte erreichen mit wenigen fmol Probe eine Auflösung im unteren ppm-Bereich, wobei das Spektrum einer Probe nach mehreren hundert abgegebenen Laser-Schüssen und nachfolgender Mittelung der Daten erhalten wird.

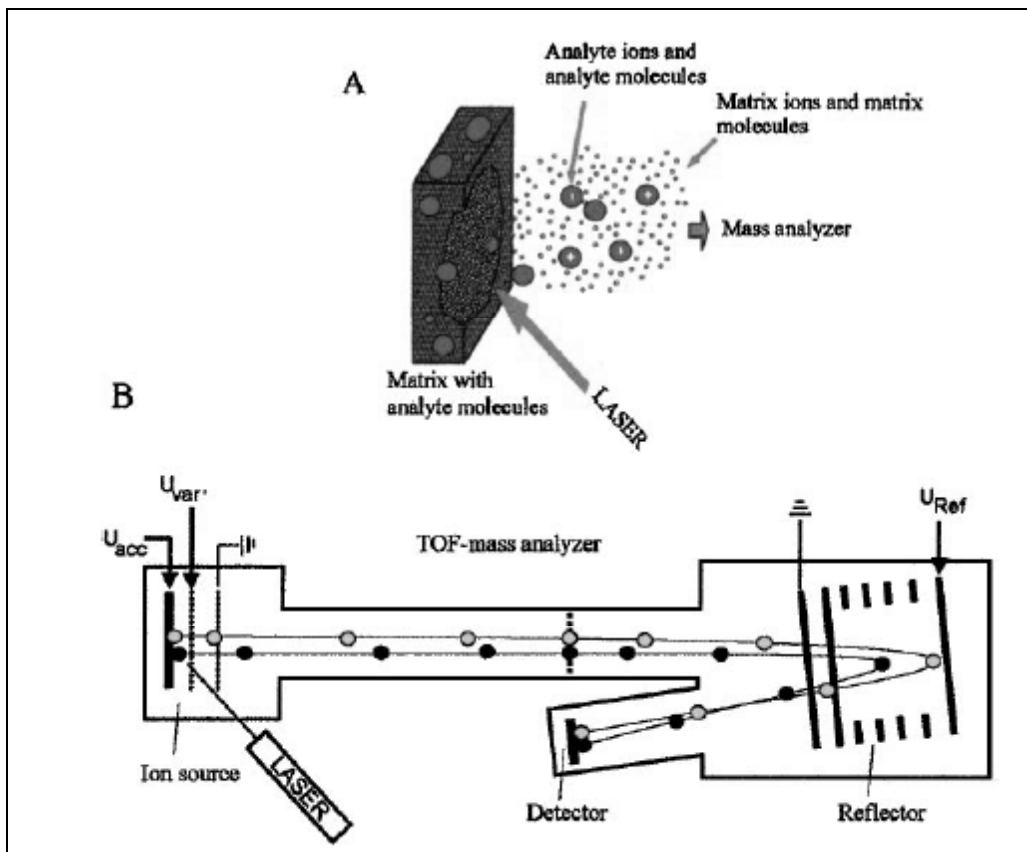


Abb. 1.8: Mechanismus des MALDI-Prozesses (A, oben) und Schema eines entsprechenden Geräts (B, unten) [Mann, et al., 2001].

Der große Vorteil von MALDI-TOF ist die hohe Sensitivität und Genauigkeit, weshalb diese Methode vor allem zur Massenbestimmung von tryptisch verdauten Proteinen mit Massen von 700-3500  $m/z$  angewendet wird. Über den erhaltenen *Massen-fingerprint* der Peptide kann das Protein über Datenbanken identifiziert werden.

Die Eigenschaft, dass trotz „sanfter“ Ionisation einige Ionen während des Fluges spontan fragmentieren (*post source decay* - PSD), wird bei der PSD-Messung angewendet [Spengler, et al., 1992]. Durch variable Reflektorspannung wird ausgehend von einem Mutterion, dessen Zerfall bis zum kleinsten Bruchstück, dem C- oder N-terminal geladenen Aminosäurenfragment, nacheinander in mehreren Messsektoren detektiert (Zerfallsmuster: s.a. 1.3.2). Im Anschluss werden die einzelnen Spektren der Messbereiche zu einem PSD-Spektrum zusammengefügt. Prinzipiell ist daraus die Sequenz eines Peptides zu erhalten, jedoch ist die Methode im Vergleich zur Messung des *Massen-fingerprints* aufgrund der geringen Zerfallsrate (2-5 %) nicht sehr sensitiv.

Da besonders die Sequenzierung von Peptidfragmenten extrem interessant ist, wird versucht, die MALDI-Quelle neben dem TOF mit anderen Analysatoren zu koppeln, mit denen sich die hohe Sensitivität von MALDI auf die Sequenzbestimmung übertragen lässt. Daher wurde das MALDI-qTOF entwickelt, bei dem vor dem TOF ein Quadrupol geschaltet ist [Shevchenko, et al., 2000]. Allerdings werden beim MALDI-Prozess weniger Ionen als beim ESI gebildet, daher ist dieses Verfahren noch problematisch. Doch sind mit dieser Methode auch schon Proteome, von bisher auf Genomebene nicht sequenzierten Organismen, untersucht worden, wobei mit den Ergebnisse eine spezielle Datenbankabfrage (BLAST) durchgeführt wurde, um die Proteine zu identifizieren [Shevchenko, et al., 2001].

Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die Verwendung von zwei hintereinander geschalteten TOFs, die durch eine Fragmentierungskammer voneinander getrennt sind [Medzihradszky, et al., 2000]. Trotz sehr schneller Analysezeiten und höherer Auflösung ist auch hier die geringe Anzahl der durch das MALDI gebildeten Ionen limitierend. Doch kann dieses Problem durch höhere Pulsraten des Lasers umgangen werden.

Mit der Durchführung des MADLI-Prozesses bei normalem Luftdruck ist, bedingt durch die schnellere (kein Vakuumaufbau in der Probenkammer) und genaue Analyse, eine Automatisierung möglich, die auch die Möglichkeit zur Verwendung von mobilen Geräten bietet [Moyer und Cotter, 2002].

### 1.3.1.2 ESI

Die Anwendungsbreite einer Elektro-Spray-Quelle ist vielfältig und gilt daher zusammen mit MALDI als wichtigste Ionisationsquelle in der Biochemie. Neben



Zuckern, Lipiden und Nukleinsäuren lassen sich auch Proteine mit ihr untersuchen. Ein Massenlimit ist bisher nicht bekannt.

Die Analyt-Moleküle liegen, im Gegensatz zu MALDI, bei der ESI-Probe in Lösung vor. Die Lösung wird kontinuierlich durch eine mit Hochspannung versehene Nadel geführt. An der Spitze dieser leitfähigen Nadel bildet sich unter Atmosphärendruck zunächst der sog. Taylor-Konus aus (Abb. 1.9). In einigem Abstand zur Anode dispergiert die Lösung zu winzigen Tröpfchen mit wenigen Mikrometern Durchmesser. Das Lösungsmittel wird dann in einem kontinuierlichen trockenen  $N_2$ -Strom verdampft. Aufgrund der Ladung und Zusammensetzung befinden sich die Tröpfchen am sog. Rayleigh-Limit, dessen Überschreitung in aufeinanderfolgende sog. Colomb-Explosionen resultiert.

Wie nun aus den nur noch wenige Nanometer großen Tröpfchen ein desolvatisiertes Analyt-Ion entsteht, ist noch nicht genau geklärt. Es existieren jedoch zwei verbreitete Theorien zu diesem Phänomen. Die erste stammt von Dole der maßgeblich zu der Entwicklung des ESIs beigetragen hat. Nach seinem *charge-residue model* dauert das Zerstäuben der Lösung durch die Colomb-Explosionen in immer kleinere Teile so lange an, bis nur noch einzelne Analyt-Ionen mit der jeweiligen Solvat-Hülle zurückbleiben. Nach Verflüchtigung der restlichen Lösungsmittelmoleküle bleiben die „nackten“ Analyt-Ionen in der Gasphase zurück, welche in das Massenspektrometer eintreten.

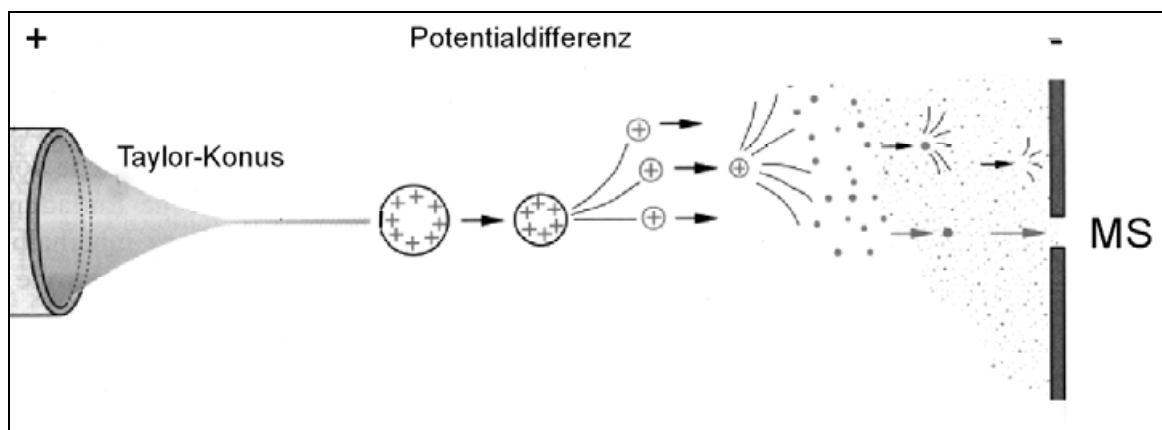


Abb. 1.9: Schema und Mechanismus der ESI-Quelle

In der Theorie von Irbarne und Thomson wird andererseits anhand des *ion evaporation model* davon ausgegangen, dass von sehr kleinen Tröpfchen (ca. 8 nm) oberhalb des Rayleigh-Limits die Unterschreitung der Grenze dadurch vermieden wird, dass von dem Tröpfchen Analyt-Ionen emittiert werden. Da auch die Solvat-Hülle nach und nach kleiner wird, kommt es zu einer kontinuierlichen Emission der Ionen.

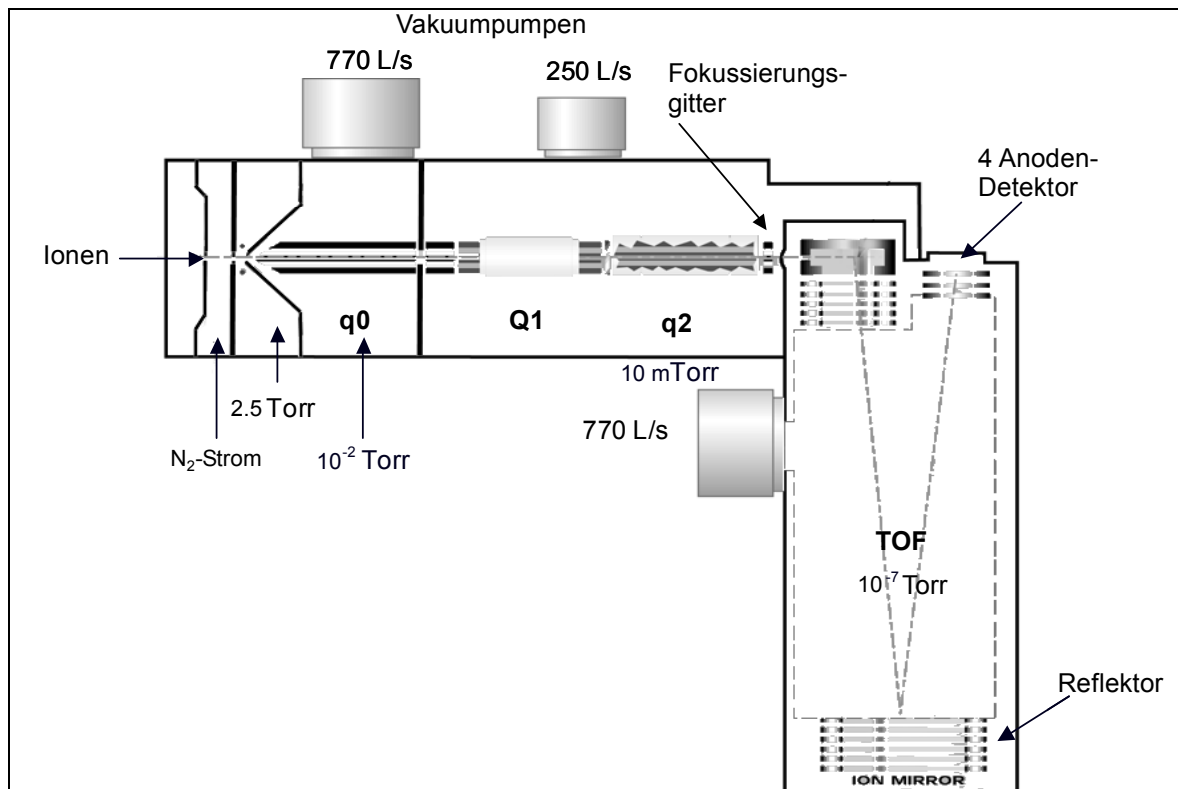
Es wurden zahlreiche Experimente entwickelt, um beobachtete Phänomene mit dem einen oder anderen Modell zu erklären. Für die Analyse von Peptiden scheint jedoch das Ionenemissionsmodell überzeugender zu sein, [John Fenn et al. 1995]

Der schonenden Ionisation bei Atmosphärendruck folgt die Analyse der gebildeten Ionen im Vakuum. Die Schnittstelle ist für einen effizienten Transfer besonders wichtig. Bei der Ionisation und dem nachfolgenden Übergang in das Gerät ist festgestellt worden, dass die Sensitivität vom Lösungsmittelstrom unabhängig ist, jedoch besteht eine Abhängigkeit zur Analytkonzentration. Bei zu hohem Lösungsmittelstrom gelangt ein Teil der Probe nicht mehr in das Massenspektrometer. Daher ist es erstrebenswert, die Flussraten möglichst gering zu halten, was zur Etablierung der nano-Elektrospray-Quelle führte.

Als Nadel fungiert eine metallüberzogene Glaskapillare, mit der ein Fluss von 5-20 nL pro min erreicht wird und bei der kein äußerer Druck mehr auf die Kapillare ausgeübt werden muss. Die niedrigen Flussraten sind gleichfalls bei der Verbindung des MS mit einer HPLC erstrebenswert, weshalb die Entwicklung entsprechender HPLC-Systeme in dieser Richtung vorangetrieben wurde.

Als Analysator wird in Kombination mit der ES-Quelle ein Quadrupol eingesetzt. Die Ionen werden zwischen vier stabförmigen Elektroden durch ein kombiniertes Gleich- und Wechselfeld nach ihrem  $m/z$ -Verhältnis getrennt. Dies ist abhängig von der angelegten Gleichspannung und der Amplitude des Wechselfeldes. Durch Hintereinanderschalten von zwei Quadrupolen, auch Tandem-Massenspektrometer genannt, können Fragmentierungs-Experimente durchgeführt werden, aus denen sich die Sequenz von Peptiden bestimmen lässt. Jedoch ist die Auflösung und Sensitivität geringer als bei einem TOF-Analysator. Daher wurden in den letzten Jahren Geräte entwickelt, bei denen TOF und Quadrupol kombiniert sind, was als sog. qTOF bezeichnet wird.

Im abgebildeten Schema eines ESI-Massenspektrometers (Abb. 1.10) sind drei Quadrupole und ein TOF enthalten. Der erste Quadrupol  $q_0$  dient lediglich zur Fokussierung des Ionenstrahls. Im sog. TOF-Modus sind alle folgenden Quadrupole freigeschaltet, so dass die Masse über die Flugzeit genau bestimmt werden kann. Beim MS/MS-Modus filtert Q1 ein ausgewähltes Peptid heraus, welches in q2 durch *collision induced dissociation* (CID) mittels eines Stoßgases ( $N_2$ ) fragmentiert wird. Die Masse der Bruchstücke wird dann durch das TOF bestimmt.



**Abb. 1.10:** Schematischer Querschnitt eines ESI-Analysators mit drei Quadrupolen und nachgeschaltetem TOF-Analysator (Erklärung s. Text)

Verbinden lässt sich die ESI-Quelle auch mit zwei anderen Analysatoren, die jeweils Ionen über ein dreidimensionales elektrisches Feld einfangen. Zum einen ist das die Ionenfalle, mit dem über das elektrische Feld die gewünschten Ionen auf eine stabile Kreisbahn gebracht und anschließend fragmentiert werden. Dieser Prozess ist im Prinzip beliebig oft wiederholbar, woraus  $MS^n$ -Spektren erhalten werden. Der Vorteil dieser Methodik besteht darin, dass auch zwischen Aminosäure-Fragmenten gleicher Masse, wie Leucin und Isoleucin unterschieden werden kann, was bei  $MS^2$  noch nicht möglich ist.

Zusätzlich existiert noch das Fourier transform cyclotron. Dabei lassen sich durch Kombination des elektrischen mit einem magnetischen Feld analoge Experimente mit einer extrem hohen Auflösung ( $Re_{FTC} = 1 \cdot 10^7$  gegenüber  $Re_{QTOF} = 1 \cdot 10^4$ ) und Sensitivität durchführen.

### 1.3.2 Probenvorbereitung und Auswertung

Neben der Bestimmung der Masse vorwiegend rekombinanter Proteine ist besonders die massenspektrometrische Analyse von Peptidgemischen in der Proteinbiochemie von Interesse.

Im Allgemeinen wird vom gewünschten biologischen Material ein Zelllysat präpariert, das im Anschluss weiter subfraktioniert werden kann. Meist folgt die Trennung des Proteingemisches mittels 1D- oder 2D-Gelen. Aus diesen können anschließend Banden oder punktförmige Banden (*Spots*) ausgeschnitten werden, die dann enzymatisch hydrolysiert wurden. Doch kann die Verwendung eines Gels auch vermieden werden und das Proteingemisch direkt einer Hydrolyse mittels Enzymen unterzogen werden. Als Enzym findet meist Trypsin Anwendung. Trypsin ist eine Serin-Protease, die die Spaltung von Peptidbindungen C-terminal von Arginin und Lysin katalysiert. Die Spezifität ist eingeschränkt, wenn es sich bei der benachbarten Aminosäure um Prolin handelt. Doch sind auch andere Enzyme wie Chymotrypsin, die Endoproteinase LysC, sowie die Kombination verschiedener Verfahren anwendbar. Aufgrund der hohen Sensitivität ist es besonders bei diesem Schritt wichtig, Kontamination mit Keratin, welches durch Staub, kontaminierte Probengefäße oder durch Arbeit ohne Handschuhe hervorgerufen wird, zu vermeiden.

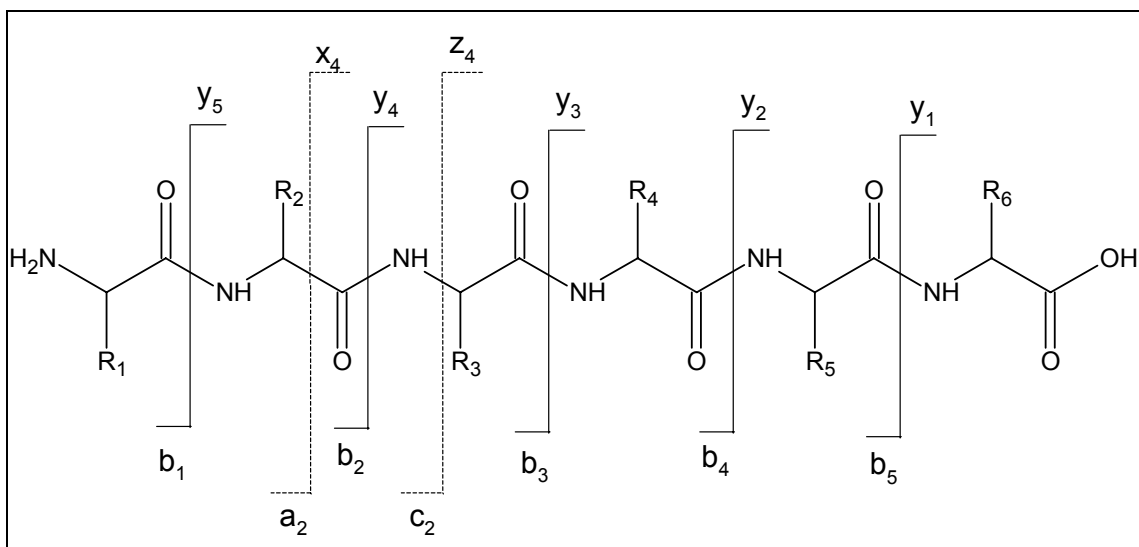
Zur Detektion der Spots oder Banden gibt es eine Vielzahl an Färbemethoden. Dabei können die Gele wahlweise mit Coomassie, Silber oder Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt werden, wobei durch das MS Banden im Bereich von 1 pmol analysiert werden können. Die Menge, die ein Massenspektrometer erfassen kann, wenn die Probe direkt appliziert wird, liegt in dem Bereich von wenigen Femtomolen.

Wichtig für die Massenspektrometrie, insbesondere bei ESI ist, dass die Probe bei der Messung frei von Salzen und Detergenzien ist. Daher werden die Peptide mit hydrophoben Säulenmaterialien meist nochmals entsalzt. Für den Ionisationsprozess ist es ferner wichtig, dass die Proben angesäuert vorliegen. So ist beim ESI-Prozess eine starke Abhängigkeit des Spektrums vom pH-Wert beobachtet worden [A. P. Snyder, 2000]. Einen weiteren Einfluss auf das Spektrum übt das verwendete Lösungsmittel aus.

Zur Identifizierung von Proteinen werden prinzipiell zwei Methoden angewendet. Mit der Massenspektrometrie können zwei Parameter aus Sequenz-Datenbanken bestimmt werden, die zur Identifizierung von Proteinen herangezogen werden können; die Masse und die Sequenz der Peptidfragmente. Die schnellste Methode ist der sog. Massenfingerprint, bei dem nach tryptischem Verdau eines Spots, die Masse der enthaltenen Peptide bestimmt wird. Dies erfolgt meist mittels MALDI-TOF.

Anschließend erfolgt der Vergleich der gemessenen Massen mit den theoretischen tryptischen Massen aus Einträgen der Datenbanken, wobei generell mindestens drei Peptidmassen zugeordnet werden müssen, um einen eindeutigen Treffer zu erhalten [Yates, 2000]. Für diese Art der Identifizierung ist eine hohe Massengenauigkeit wichtig, da mit steigender Genauigkeit auch die Anzahl der Peptide, die der gemessenen Masse ähneln, kleiner werden. Generell wird die Methode dort eingesetzt, wo eine einzelne Proteinkomponente schnell identifiziert werden soll.

Die zweite Methode verwendet Informationen aus Peptidsequenz-Daten, die durch MS/MS-Experimente generiert werden. Bei der sog. Niedrig-Energie-Fragmentierung (10-50 eV) reicht ein Stoß mit einem N<sub>2</sub>-Molekül noch nicht zum Bindungsbruch aus [Mann, et al., 2001]. Nach mehreren Kollisionen kommt es bevorzugt zur Spaltung entlang des Peptidrückgrades (Abb. 1.11). Die Nomenklatur von Bieman (1988) bezeichnet die unterschiedlichen Fragmente. Wenn die Ladung am N-Terminus verbleibt, handelt es sich um a, b und c-Ionen, wenn sie am C-Terminus verbleibt, handelt es sich um x, y und z-Ionen. Da bei tryptischen Peptiden am C-Terminus entweder positiv geladene Lys oder Arg befinden, sind y-Ionen die dominierenden Spezies.



**Abb. 1.11:** Peptidrückgrad; die potentiellen Fragmente sind mit Buchstaben gekennzeichnet

Meist ist nur in klaren Tandem-Massenspektren die Sequenz eines Peptides komplett zu erhalten, doch auch kurze Abschnitte enthalten eine spezifische Information. Die Auswertung erfolgt meist computergestützt, was nicht nur die Detektion der y-Ionen, die manuell noch in endlicher Zeit auswertbar sind, sondern auch andere Fragmentationen erkennen lässt. Da mit den gewonnenen Daten nicht nur die Masse

des Peptides sondern auch Sequenzinformationen gewonnen werden, lässt sich eine Datenbankrecherche sehr viel spezifischer durchführen. So sind schon ein bis zwei Tandem-Massenspektren, die mit einem Protein übereinstimmen, ausreichend, um letzteres, mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit, zu identifizieren [Yates, 2000].

Die Recherche mit den Tandem-MS-Daten lässt sich gegen verschiedene Datenbanken durchführen. So ist ein Abgleich der Daten mit bekannten Protein-Sequenzen möglich. Daneben können mit den Ergebnissen der Massenspektrometrie sog. EST-Datenbanken durchmustert werden, wodurch auch hypothetische Proteine erfassbar sind [Mann, 1996; Neubauer, et al., 1998]. Oder aber es erfolgt der Vergleich direkt auf Ebene des Genoms. Der Vorteil gegenüber der EST-Datenbank ist hierbei, dass die vorhandenen Genom-Daten eine höhere Qualität aufweisen.

Ein weiterer wichtiger biologischer Aspekt, der mittels Massenspektrometrie untersucht werden kann, sind die Aspekte der Regulation über posttranslationale Modifikationen. Die posttranslationalen Modifikationen können nur bedingt vorhergesagt werden und müssen daher experimentell bestimmt werden.

Die Phosphorylierung ist im Rahmen der Signaltransduktion innerhalb der Zelle von größter Wichtigkeit und erfolgt zumeist an Ser und Thr, wo hingegen die Phosphorylierung von Tyr-Resten nur eine untergeordnete Rolle spielt [Hunter, 1998]. Die Bestimmung der Phosphorylierungsstellen kann nach Anreicherung der phosphorylierten Peptide auf unterschiedliche Weise erfolgen. Einerseits kann ein Vergleich zwischen mit Alkalischer Phosphatase behandelten und unbehandelten Peptiden erfolgen und so der Grad der Phosphorylierung festgestellt werden. Mit den Daten lässt sich auch eine exaktere Vorhersage über die potentielle phosphorylierte Position machen. Mit dem Massenspektrum lässt sich die genaue Stelle über den Verlust beispielsweise eines Phospho-Serins im MS/MS-Spektrums nachweisen. Alternativ lassen sich im Negativ-Modus des Spektrometers über einen Vorläufer-Ionen-Scan, die Peptide, die eine Masse von 79 m/z ( $\text{PO}_3^{2-}$ ) verloren haben, bestimmen.

Daneben existieren noch weitere posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Acetylierung, Acylierung und Glykosylierung, die ebenfalls über Massenspektrometrie zu bestimmen sind [Burlingame, et al., 1998].

Die Massenspektrometrie ist generell eine qualitative Analysemethode, da die Flugeigenschaften der einzelnen Peptide, welche sich in der massenspektrometrischen Analyse niederschlagen, unterschiedlich sind. So ist zum Beispiel beim MALDI das überproportionale Vorkommen von Peptiden mit C-terminalen Arg gegenüber solchen mit Lys beobachtet worden [Krause, et al., 1999], was den quantitativen Vergleich erst

recht unmöglich macht. Generell ist die Signalintensität nur bedingt proportional zur Menge des Peptids.

Eine Möglichkeit zur quantitativen Unterscheidung zwischen zwei Zuständen zu ermöglichen, besteht in der Isotopenmarkierung. Dies kann bei Mikroben durch Verwendung von  $^{15}\text{N}$ -haltigem Medium erreicht werden, in dem eine Kultur mit und eine ohne dieses Isotop kultiviert wird. Eine Variation bei Säugerzellen ist die Verwendung von dreifach deuteriertem Leucin bzw. nicht deuteriertem Leucin der Zellkultur [Ong, et al., 2002].

Aber auch nach dem Zellaufschluss vor der Hydrolyse mit Trypsin ist eine Markierung der Proteinmixturen mittels isotopenmarkierten Reagenzien möglich. Eine Methode besteht in der Reaktion der Thiol-Gruppe der Cys-Seitenkette mit einem deuterierten bzw. nicht-deuterierten Biotin Derivat (sog. ICAT) [Gygi, et al., 1999]. Über eine Affinitätschromatographie lassen sich die biotinylierten Peptide anreichern und anschließend im Massenspektrum quantitativ auswerten. Der Nachteil an dieser Methode ist, dass nur Cys-haltige Peptide detektiert werden und manche Proteine kein Cys enthalten. Doch wird durch die Reduktion der Komplexität die Interpretation der Spektren vereinfacht. Dieser Nachteil wird durch eine andere Strategie, bei dem der N-Terminus der Peptide mit einem Nikotinsäurederivat reagiert umgangen. Diese Markierung soll zusätzlich noch die Sensitivität aufgrund der Basizität des Nikotinsäure-Restes erhöhen [Munchbach, et al., 2000].

### 1.3.3 LC-MS

Die Kopplung einer HPLC mit einem Massenspektrometer, wird als LC/MS/MS, oder auch nur als LC-MS, bezeichnet. Mit ihr können Peptide aus Proteingemischen mit und ohne vorherige 1D- oder 2D-Gelelektrophorese getrennt werden.

Wie unter 1.3.1.2 beschrieben, sind extrem kleine Flussraten aufgrund der höheren Sensitivität erstrebenswert, daher erfolgte die Entwicklung eines als nano-HPLC bezeichneten Systems [Chervet et al., 1996]. Mit diesen HPLC-Anlagen können über weitere technische Modifikationen, wie das sog. *Peak Parking* [Martin, et al., 2000], Flussraten von  $5\text{-}200\text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$  erreicht werden.

Typischerweise werden die Peptide auf eine *reverse phase*-Säule aus  $\text{C}_{18}$ -Material aufgetragen und über einen LM-Gradienten getrennt. Anschließend erfolgt der Transfer mit einer hohen Ausbeute in das Massenspektrometer. Zur Verbindung an die ESI-Quelle wird meist eine spezielle, mit einem leitenden Material beschichtete

Elektrospray-Nadel verwendet, wobei diese direkte Anbindung der HPLC an das MS als *on-line*-Messung bezeichnet wird. Alternativ existieren auch sog. *liquid junctions* [Davis, et al., 1995] oder das Anlegen der Spannung vor der Säule [Gatlin, et al., 1998].

Neuere Entwicklungen gehen dahin, dass die C<sub>18</sub>-Säule mit anderen Trennsäulen kombiniert wird, wie zum Beispiel der Ionenaustauschchromatographie. Die 2D-Chromatographie kann dabei zur effektiven Trennung von komplexen Proteinmischungen verwendet werden [Link, et al., 1999], wodurch meist eine höhere Sequenzabdeckung erreicht werden kann. In Kombination mit Affinitätschromatographie ist sogar eine dreidimensionale Trennung möglich. So sind ICAT-markierte Peptide zunächst über Ionenaustauschchromatographie getrennt worden. Anschließend erfolgte eine Affinitätschromatographie und schließlich das Auftragen der Proben auf eine LC-MS-Apparatur, wobei beim letzten Schritt die Peptide durch eine RP-Säule getrennt wurden [Gygi, et al., 2002]. Allerdings wurden die ersten beiden Schritte nicht *on-line* durchgeführt.

Zusammenfassend ist die LC-MS-Methodik ideal zum Messen von komplexen Proteinmischungen und aufgrund der Limitationen der 2D-Elektrophorese hervorragend geeignet, Membranproteine zu untersuchen.



## 2 Aufgabenstellung

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) reguliert den Transport in das und aus dem Gehirn. Die zum Schutz des Gehirns aufgebaute selektive Barriere ist allerdings auch für viele Medikamente nicht passierbar, was die Wirkung von vielen ZNS-Therapeutika herabsetzt [Abbott und Romero, 1996].

Auf zellulärer Ebene wird die BHS vor allem von den Hirnkapillarendothelzellen gebildet. Bei Isolierung und nachfolgender Kultivierung dieses Zelltyps wird ein Verlust der Aktivitäten der Markerproteine  $\gamma$ -GT und Alkalische Phosphatase beobachtet. Somit tritt eine Dedifferenzierung der Zellen auf.

Mit Hilfe der Markerproteine ZO1 und Alkalische Phosphatase sollten kultivierte Endothelzellen charakterisiert werden. Zur Bereitstellung des benötigten Zellkulturmaterials hatte zunächst die Präparation von Hirnkapillarendothelzellen zu erfolgen. Aufgrund der engen genetischen Verwandtschaft zwischen Mensch und Schwein sollten Endothelzellen des Schweins für die Experimente eingesetzt werden. Die isolierten Zellen waren anschließend in Kultur zu nehmen, um Zellen von 2 Zuständen zu erhalten. Zustand A sollte kultivierten mikrovaskulären Endothelzellen entsprechen, welche Blut-Hirn-Schranke spezifische Eigenschaften besitzen. Zustand B sollte kultivierten mikrovaskulären Endothelzellen entsprechen, welche keine Blut-Hirn-Schranke spezifischen Eigenschaften mehr besitzen. Diese Zustände sollten unter den gegebenen Bedingungen über die Markerproteine charakterisiert werden, um die Dedifferenzierung der Zellen in Kultur zu zeigen.

Mit Hilfe der vergleichenden Proteomanalyse sollten kultivierte Endothelzellen des Zustands A und des Zustands B des cerebralen Durchblutungssystems auf spezifische Proteine der Blut-Hirn-Schranke hin untersucht werden. Das langfristige Ziel ist hierbei, mittels entdeckter Transportproteine spezifische gehirngängige Medikamente für den Menschen zu entwickeln.

Aus diesem Grund sind hauptsächlich Membranproteine als *Targets* interessant, da über die Zelloberfläche der Stofftransport und die Weiterleitung von Signalen erfolgen. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit *Lipid rafts*, als potentielle Zentren dieser Prozesse, aus verschiedenen Geweben und Zellkulturedien isoliert und analysiert werden. Zur Etablierung des Anreicherungsverfahrens war zunächst Cortex-Gewebe zu verwenden. Die Methode sollte anschließend auf kultivierte Zellen übertragen werden.

Neben den C6-Gliomazellen waren Zellen der Passage 0 und Passage 2 kultivierter Hirnkapillarendothelzellen zur Isolierung der *Lipid rafts* einzusetzen. Die Effektivität der

Anreicherung sollte über Markerproteine bestimmt werden. Anschließend sollten die Fraktionen unter dem Gesichtspunkt der Proteomanalyse untersucht werden. Die Hauptaufgabe hierbei bestand in der Identifizierung der Proteine in den *Rafts* mittels massenspektrometrischer Verfahren.

Neben dem qualitativen Nachweis der Proteine bildete die Untersuchung der Funktionalität einiger identifizierter Proteine einen weiteren Schwerpunkt der Arbeit. Erste wichtige Schritte hierbei sind die Bestimmung der Expression und die Lokalisation der Proteine. Für bekannte Proteine werden im Allgemeinen Antikörper verwendet, die über Immunisierung eines Tieres oder die Hybridoma-Technik gewonnen werden. Über eine kombinatorische molekularbiologische Methode, das *Phage-Display*, ist es ebenfalls möglich, Antikörperfragmente herzustellen, so dass mittels eines Selektionsprozesses hochaffine Antikörper gewonnen werden können.

Ziel war es daher, eine *Phage-Display*-Bank aufzubauen, zu charakterisieren und anzuwenden. Hierbei war die Antikörpervielfalt, ausgehend von humaner DNA durch Primer zu generieren. Nach der Etablierung der Bank sollten über eine Selektion spezifische Phagen-Antikörper angereichert werden. Der Selektionsprozess sollte gegen Proteine der *Rafts* durchgeführt werden.

## 3 Materialien

### 3.1 Geräte und Reagenzien

#### Chemikalien

3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid	Sigma
ABTS	Fluka
Acetonitril <i>p. a.</i>	Roth
Agar	Sigma
Agarose	Sigma
Ameisensäure <i>p. a.</i>	Merck
Aminocaprinsäure	Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Merck
Ampicillin	Sigma
BCIP	Sigma
Bromphenolblau	Merck
Chloroform	Roth
Casein	Roth
Coomasie	Seva
$\alpha$ -Cyanozimtsäure	Sigma
DAPI	Serva
DEPC	Acros
Dextran ( $\bar{M}$ = 144 kg/mol)	Sigma
EDTA	Roth
Ethidiumbromid	Gibco
Formaldehyd	AppliChem
Glycin	AppliChem
Glycerin	Roth
Hefeextrakt	Roth
HPLC-H <sub>2</sub> O	Roth
IPTG	AppliChem
MES	AppliChem
MOPS	Biomol
n-Butanol	Roth
NBT	Sigma
n-octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid	Boehringer
PEG 4000	Roth
Percoll	Sigma
Ponceau S	Roth
Roti-Block	Roth
Rotiphorese 30	Roth
Roti-Quant	Roth
Natriumdodecylsulfat	Roth
Silbernitrat	Roth
Silikonöl	Merck
Sypro-Ruby	Genomics Solutions
Trichloressigsäure	Roth
TEMED	AppliChem
Trifluoressigsäure <i>p. a.</i>	Merck
TLCK	Sigma
Triton X-100	Fluka
Tween 20	Roth
Trypton	Roth
X-Gal	AppliChem

Xylencyanol  
Zitronensäure

AppliChem  
Roth

Allgemeine Laborchemikalien

Applichem, Fluka, Merck,  
Roth, Sigma

#### Membranen und Filter

Nitocellulose-Filter (0,2)  
Membranfilter (0,45 µm)  
Gel-Blotting Paper (GB002)  
Nitrocellulose-Membran (0,2 µm)  
PVDF-Membran (0,2 µm)

Schleicher&Schuell  
Schleicher&Schuell  
Schleicher&Schuell  
Schleicher&Schuell  
Amersham Pharmacia

#### Enzyme, Proteine, Substrate und Antikörper

*Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*

Gibco BRL

HotStar-*Taq*

Quiagen

HiFi-*Taq*

Roche

RNase A

Gibco BRL

RNase H

Gibco BRL

DNase I (RNase-frei)

Gibco BRL

Bovines Serum Albumin

Sigma

Desoxynukleotide

Gibco BRL

Superscript II RT

Gibco BRL

Anti-(GLUT1)-IgG (Kaninchen)

Chemicon

Anti-(Caveolin)-IgG1 (Maus)

BD Bioscience

Anti-(ZO1)-IgG (aus Ratte)

Chemicon

Anti-(BCRP-human)-IgG2a (Maus)

Alexis Biochemicals

Anti-(M13)-IgG (Maus)

Amersham Pharmacia

Anti-(M13)-IgG (Maus)

mit Meerettich-Oxidase konjugiert

Amersham Pharmacia

Anti-(Kaninchen-IgG)-IgG (Ziege)

mit Cy3 konjugiert

Jackson ImmunoResearch

Anti-(Ratte-IgG)-IgG (Ziege)

mit Cy3 konjugiert

Jackson ImmunoResearch

Anti-(Maus)-IgG (Ziege)

mit Cy2 konjugiert

Jackson ImmunoResearch

Anti-(Maus)-IgG (Ziege)

mit Cy3 konjugiert

Jackson ImmunoResearch

*Anti-Rabbit-IgG (Ziege, whole molecule)*

mit Alkalische Phosphatase konjugiert

Southern Biotechnology Ass.

Anti-Maus-IgG1 (Ziege)

mit Alkalische Phosphatase konjugiert

PharMingem

Anti-Maus-IgG2a (Ziege)

mit Alkalische Phosphatase konjugiert

Sigma

Complete-Protease-Inhibitor-Cocktail

Roche

Dispase II

Roche

Kollagenase D

Roche

Trypsin (*porcin*, TPCK behandelt)

Promega

Benzoase ( $\geq 25 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )

Merck

FastpNPP (Substrat: Alk. Phos.)

Sigma

*Nco* I

Gibco BRL

*Not* I

Gibco BRL

*Eco*R I

Gibco BRL

*Bam*H I

Gibco BRL

*Sfi* I

Gibco BRL

T4-Ligase

Promega

Systeme

BCA-Proteinbestimmung	Pierce
TRIzol®-Reagent	Gibco BRL
Wizard®MagneSil™ Sequencing Reaction Clean-Up System	Promega
HotStarTaq DNA Kit	Qiagen
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen
QIAprep® Miniprep	Qiagen
pGEM®-Teasy Vector System I	Promega
MinElute Gel Extraction	Qiagen

Vektoren

pBluescript	Stratagene
FUSE5	Smith Labor

Spezielle Einwegmaterialien

ZIP-TIP	Millipore
Silikonisierte Reaktionsgefäße	Biozym
Impfösen	Sarstaedt
22G-Nadel	Braun
1 mL Spritze	B·D
175-cm <sup>2</sup> -Zellkulturflaschen	Nunc
Deckglässchen	Fisher Scientific
12-Lochplatten	Nunc
Objekträger	Superfrost
Zellschaber	Dispenser
Elektroporationsküvetten	EquiBio

Allgemeine Geräte

Dot-Blot-Apparatur	Schleicher&Schuell
Färbeschale (lichtdicht)	Werkstatt TUD
ELISA-Reader	BMG-Labtechnologies
FLA-3000 (Fluoreszenzscanner)	Fuji
Glashomogenisatoren	Dounce
Geltrockner	Biometra
Immunoschüttler	Heidolph
pH-Meter	WTW
Protean II-Gelelektrophoreseapparatur	BioRad
Gelelektrophoreseapparatur	TUD
Gradientenmischer	BioRad
Peristaltische Pumpe	Saia
Heizblock	Stuart Scientific
Hamilton-Spritze	Hamilton-Bonaduz
Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur	PeqLab
Durchlicht-Scanner	Umax
GeneQuant pro (UV/VIS-Spektralphotometer)	Pharmacia Biotech
Vortexer	Janke & Kunkel
Blaulichttisch	Molecular Probes
Schüttler HS 501D	Janke & Kunkel
Gefrierschrank (-80°C)	Revco
IDA (Agarose-Geldokumentation)	Raytest
Western Blot-Apparatur	BioRad
Wasserbad	GFL
Zentrifugenröhrchen	Kontron
Micro Pulser (Elektroporator)	BioRad
Spannungsgeräte	Consort E831, TUD

Zentrifugen

Beckman-Präp	Beckman
Megafuge	Heraeus
Variofuge RF	Heraeus
LE-80K	Beckman
Mikroliter Tischzentrifuge	Fischer Scientific
Speed-Vac Univapo 150 H	Uniequip
Centrifuge 5417R	Eppendorf
Centrifuge 5810	Eppendorf
Sorval RC-5B	DuPont

Massenspektrometrie

Pico tip FS360-20-10-D20, bzw. -D5; coating 1P-4P	New Objective
MEDIUM nanoES spray capillary ES 380	Protanna
Voyager-DE <sup>TM</sup> PRO Biosectrometry Workstation	PE Biosystems
API-QSTAR-Pulsar	Applied Biosystems
FAMOS <sup>TM</sup> , SWITCHOS <sup>TM</sup> , ULTIMATE <sup>TM</sup> (nano-HPLC)	LC Packings

PCR-Geräte und DNA-Sequenzierung

ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
ABI Prism <sup>®</sup> BigDye <sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits	PE Biosystems
DNA engine DYAD	MJ Research
DNA engine OPTICON	MJ Research
Hi-Di <sup>TM</sup> formamid	PE Biosystems
PTC-200	MJ Research
SybrGreen	Sigma

Zellkultur und Mikroskopie

Mikroskope:	
Axiovert 200	
mit Filtersätzen 5, 10, 15	Zeiss
TCS-NT-System mit DMIRIE-Mikroskop	Leica
Brutschrank	Binder
Sterilwerkbank	Heraeus
Adultes bovines Rinderserum	PAA
Penicilin	Biochrom
Gentamycin	Biochrom
Kollagen G	Biochrom
Trypsin	Biochrom
Medium M199	Biochrom
C6-Zellen	Amer. Type Culture Collection
Gehirne aus Schwein	Schlachthof Bensheim
Kaisers Glyceringelatine	Merck
Immersionsöl	Merck

Datenbanken und Internetressourcen

EMBL:	European Molecular Biology Laboratory, Data Library Nucleotide Sequence Database, Heidelberg <a href="http://www.embl-heidelberg.de">http://www.embl-heidelberg.de</a> <a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw">http://www.ebi.ac.uk/clustalw</a>
NCBI:	National Center for Biotechnology Information, USA <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST</a>

SWISS-PROT:	Derpartment de Biochimie Medicale Centre Medical Universitaire, Genf, Schweiz <a href="http://www.swissport.com">http://www.swissport.com</a>
Expasy:	ExPASy Molecular Biology Server Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) <a href="http://www.expasy.ch">http://www.expasy.ch</a>
Primer3-input:	<a href="http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi">http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi</a>
MASCOT:	<a href="http://www.matrixscience.com/cgi/index.pl?page=../home.html">http://www.matrixscience.com/cgi/index.pl?page=../home.html</a>
Profound:	<a href="http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe">http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe</a>
GeneCards:	<a href="http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards/">http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards/</a>

### Computerprogramme

Analyst QS	Applied Biosystems
Pepsearch	Applied Biosystems
Data Explorer	Applied Biosystems
Ultichrom 3.1	LC Packings
Aida 2.4.3	raytest
EditSeq	Lasergene
SeqMan	Lasergene
MapDraw	Lasergene
Canvas	Deneba
Axiovision	Zeiss
Imaris3	bitplane
LCS lite	Leica

### Bakteriestämme:

DH5 $\alpha$ :	$F^- \phi 80/lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1$ $hsdR17(rk^-, m_k^+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 \lambda^-$
TG1:	$F^- \Delta(lac-pro) supE thi hsdR5 traD36 proA^+B^+ lacI^f$ $lacZ\Delta M15$

### Oligonukleotide

I:	5'-GGA GAA TTC GGC GAA ATT GTG TTG ACG CAG-3'
II:	5'-TCC GGA TCC TCC ACC TTG GTC CCT TGG CCG-3'
III16:	5'-GGT GAA TTC GTT TCT TCT GAG CTG ACT CAG-3'
III22:	5'-GGA GAA TTC GGC GAA ATT GTG TTG ACG CAG-3'
IV16:	5'-ATC CCA TGG CAC CTT CTG CAG ACC TAC CTG-3'
IV22:	5'-TCC GGA TCC TCC ACC TTG GTC CCT TGG CCG-3'
a:	5'-GCG GCC CAG CAT GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG-3'
b:	5'-CGT TCC CTG GCC CCA GTA GTC AAA MNN MNN MNN MNN TTT CGC ACA GTA ATA TAC G-3'
c:	5'-TTA TTA CTC GCG GCC GAC GTG GCC GCG GCC CAG CAT GCC ATG GCC GAG-3'
d:	5'-CCC GCT ACC GCC ACT GGA CCC ATC GCC ACT CGA GAC GGT GAC CAG TTT TCC CTG GCC CCA GTA GTC-3'
e16:	5'-GAT GGG TCC AGT GGC GGT AGC GGG GGC GCT CGA CTT TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CCT-3'
e22:	5'-GAT GGG TCC AGT GGC GGT AGC GGG GGC GCG TCG ACT GGC GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CC-3'
f16:	5'-CTT GGT CCC TCC GCC GAA TAC MNN MNN MNN ACC ACT GCT GTC CCG GGA GTT ACA-3'

f22:	5'-CAC CTT GGT CCC TTG GCC GAA CTG MNN CGG MNN MNN ACC MNN CTG CTG ACA GTA ATA CAC TGC-3'
g16:	5'-AAT AAT GAG CGG GCC CCA GAG GCC CCA CTT GCG GCC GCT TTG ATT TCC TTG GTC CCT CCG CCG AAT-3'
g22:	5'-AAT AAT GAG CGG GCC CCA GAG GCC CCA CTT GCG GCC GCT TTG ATT TCC ACC TTG GTC CCT TGG CCG AAC G-3'
h16/h22:	5'-GATGGGTCCAGTGGCGGTAGCGGG-3'
FuseseqA:	5'-CGAAAGCAAGCTGATAAACCGATACA-3'
FuseseqB:	5'-AGCATTCCACAGACAGCCCTCATAGTT-3'
T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
M13 reverse	5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'
Cav2a:	5'-GGG CAA CAT CTA CAA GCC CAA C-3'
Cav2b:	5'-TGC CAT CGA AAC TGT GTG TTC C-3'
Hyp_2a:	5'-CAG CCT GAC CCA TTG GAA GAA G-3'
Hyp_2b:	5'-CGT CCA CAC GGA TCT GAG AAA G-3'
M13:	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'
M13.rev:	5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'
ABCG2.s1:	5'-TCT TAG CTG CAA GGA AAG ATC C-3'
ssABCG2.as1:	5'-CGA AGA GCT GCC GAG AAC TGT A-3'
GLUT1.s1:	5'-GGT CCT GTT CTT CAT CTT CAC C-3'
GLUT1.as1:	5'-GTT GCT TGT CTG AAT GGA CTG A-3'

KalibriersubstanzenKalibriersubstanz-MALDI:

PE Biosystems

Standard 1 und 2

(des-Arg1-Bradykinin	(M+H <sup>+</sup> =904,4681 m/z),
Angiotensin 1	(M+H <sup>+</sup> =1296,6853 m/z),
Glu1-Fibrinopeptid B	(M+H <sup>+</sup> =1570,6774 m/z),
ACTH (1-17)	(M+H <sup>+</sup> =2093,0867 m/z),
ACTH (18-39)	(M+H <sup>+</sup> =2465,1989 m/z)

Kalibriersubstanz-ESI:

Applied Biosystems

(NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> -ALILTLVS-COO <sup>-</sup> )	(M+H <sup>+</sup> =829,5393 m/z),
CsCl	(M(Cs <sup>+</sup> ) = 132,9094 m/z)

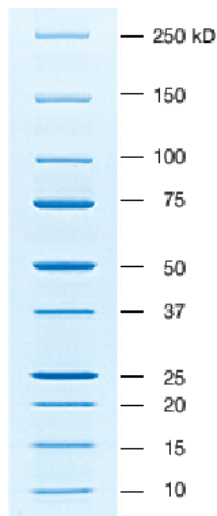
Peptidstandard (HPLC):

Sigma

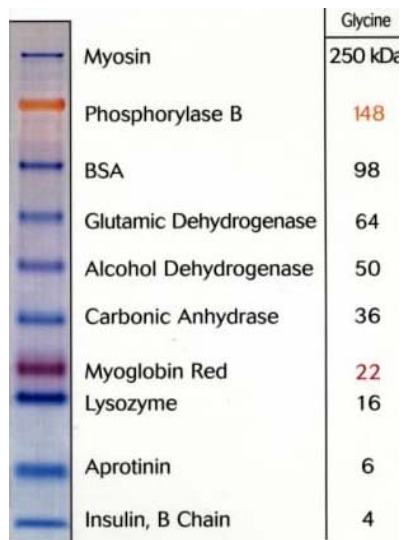
Bradykinin	(M+2H <sup>+</sup> =530,783 m/z),
Bradykinin 1-5	(M+2H <sup>+</sup> =573,304 m/z),
[Arg8]Vasopressin	(M+2H <sup>+</sup> =542,718 m/z),
Leu- Enkephalin	(M+H <sup>+</sup> =555,321 m/z),
Met-Enkephalin	(M+H <sup>+</sup> =573,330 m/z),
LHRH	(M+2H <sup>+</sup> =591,791 m/z),
Oxytocin	(M+2H <sup>+</sup> =504,226 m/z),
Substanz P	(M+2H <sup>+</sup> =674,379 m/z),
Bombesin	(M+2H <sup>+</sup> =810,43 m/z);
je 50 pmol·L <sup>-1</sup> in HPLC-H <sub>2</sub> O	



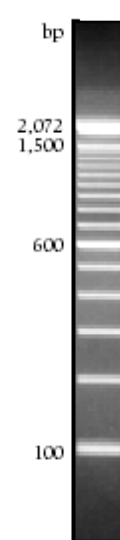
### Größenmarker für die Gelelektrophorese



SilverStain-Standard  
4-12%igen SDS-Gel  
(BioRad)



SeeBlue-Standard im  
im 4-12%igen SDS-Gel  
(Gibco)



0,5 µg DNA-Standard  
im 2%igen Agarosegel  
(Gibco)

### 3.2 Häufig verwendete Puffer und sterile Medien

<i>PBS<sup>2-</sup>-Puffer, pH 7,2:</i>	140	mM	NaCl
	8	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	3	mM	KCl
<i>TBST-Puffer, pH 8,0:</i>	10	mM	Tris-HCl
	150	mM	NaCl
	0,05	% (v/v)	Tween 20
<i>Medium M199 mit Zusätzen:</i>	8,92	% (v/v)	Adultes Bovines Rinderserum
	5·10 <sup>4</sup>	U	Penicilin
	90	µg·mL <sup>-1</sup>	Streptomycin
	90	µg·mL <sup>-1</sup>	Gentamycin
	8,92	% (v/v)	Adultes Bovines Rinderserum in M199
<i>LB-Medium: pH 7,5</i>	1,0	% (w/v)	Casein
	0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
	0,5	% (w/v)	NaCl
<i>2 x YT-Medium: pH 7,0</i>	1,6	% (w/v)	Trypton
	1,0	% (w/v)	Hefeextrakt
	0,5	% (w/v)	NaCl
<i>Medium-Agar:</i>	jeweiliges Medium mit 1,5 % (w/v) Agar		

## 4 Methoden

### 4.1 Isolierung von Hirnkapillarendothelzellen

[mod. nach Franke et al., 2000]

Die Hirnkapillarendothelzellen werden durch aufeinanderfolgende mechanische und enzymatische Schritte aus Schweinehirnen isoliert. Für die Präparation wurde insbesondere die kapillarreiche Region des Cortex verwendet [Wolf et al., 1996].

<i>Medium:</i>		M199	
<i>PercollA:</i>	54	% (v/v)	Percoll
	6	% (v/v)	10x M199 in PBS <sup>2-</sup> -Puffer
<i>PercollB:</i>	18	% (v/v)	Percoll
	2	% (v/v)	10x M199 in PBS <sup>2-</sup> -Puffer
<i>Earle's puffer pH 7,2</i>	120	mM	NaCl
	5	mM	KCl
	1	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,8	mM	MgSO <sub>4</sub>
	1,6	mM	CaCl <sub>2</sub>
	5,4	mM	D-Glukose
	26	mM	NaHCO <sub>3</sub>
<i>10x Dispase-Lösung:</i>	50	mg·mL <sup>-1</sup>	Dispase in M199
<i>Dextranlösung:</i>	15	% (w/v)	Dextran in Earle's Puffer
<i>Kollagenase D</i>			
<i>Benzoase (<math>\geq 25 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}</math>)</i>			
<i>TLCK</i>			
<i>Lysepuffer A:</i>	169	mM	NaHCO <sub>3</sub>
<i>Lysepuffer B:</i>	660	mM	NH <sub>4</sub> Cl
	25	mM	KCl
	4	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	8,8	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	25,2	mM	D-Glukose
<i>Lysepuffer C:</i>	10	mM	MgCl
	2,25	mM	MgSO <sub>4</sub>
	12	mM	CaCl <sub>2</sub>

Aus frisch geschlachteten Schweinen wurden 37 Hirnhälften entfernt und in Earle's Puffer auf Eis in das Labor transportiert. Von den Hirnhälften wurden *Cerebellum* und *Bulbus olfactorius* entfernt und das restliche Gewebe gewogen. Anschließend wurden die Hirnhäute und alle äußeren Blutgefäße entfernt. Die Großhirnrinde wurde von anderen Bestandteilen mit einem Skalpell abgetrennt. Zusammen mit Resten an weißer Gehirnschubstanz wurden die Gewebestücke mit einem handelsüblichen Kräuterroller auf einer Glasplatte in ca. 1 mm<sup>3</sup> umfassende Würfelchen zerkleinert. Diese sind dann in 2 Gefäßen mit ca. 300 mL M199 schonend gerührt worden. Das Gewicht des isolierten Gewebes wurde festgehalten und das Volumen anschließend auf 900 mL mit M199 aufgefüllt.

Der erste enzymatische Schritt erfolgte durch die Zugabe von 5 mg Dispase pro Gramm isoliertem Gewebe bei 37°C im Brutschrank. Diese unspezifische, enzymatische Hydrolyse dient zur Freisetzung der Hirnkapillaren aus dem umgebenden Parenchymalgewebe.

Bei mittlerer Rührleistung in 4 Gefäßen war die Dauer dieses Vorgangs auf 3 h angesetzt, in deren Anschluss die Behandlung mit 15 %-iger Dextranlösung folgte. Dabei wurden je 100 mL Dextranlösung und 100 mL Gewebesuspension in einem Beckman-Zentrifugenröhrchen (300 mL) für 10 min unter automatischem Schütteln inkubiert und anschließend bei 7000 x g in einem JA-14-Rotor (Beckman) bei 4°C zentrifugiert. Die resultierenden Überstände, vor allem Myelintrümmer und fettiger Niederschlag im oberen Drittel des Röhrchens, wurden verworfen.

Die rotgefärbten Sedimente wurden für den zweiten enzymatischen Schritt mit jeweils 7,5 mL M199 resuspendiert und die Suspensionen aus 6 Zentrifugenbechern in einer Spinnerflasche vereinigt. Für den zweiten enzymatischen Schritt erfolgte die Zugabe von 30 mg Kollagenase und 3 mg TLCK pro Spinnerflasche in 4 mL M199. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden unter Rühren weitere 30 mg Kollagenase und 36 µL Benzoase, gelöst in 4 mL Medium, zu der Suspension gegeben und 75 min unter Rühren bei 37°C inkubiert.

Die Kollagenase befreit die Kapillaren von der umgebenden Basalmembran, wobei die Nebenaktivität der Protease Clostripain durch TLCK inhibiert wird. Die Benzoase baut die von zerstörten Zellen freigesetzte DNA ab und vermindert so die Viskosität der Lösung, wodurch die Inkubationsdauer deutlich verkürzt wird. Dies hat wiederum Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen, die durch eine kürzere Inkubationsdauer weniger gestresst werden.

Während der Inkubation wurden die Percoll-Gradienten hergestellt, wobei die Polyvinylpyrrolidon-beschichteten Silicapartikel keinen osmotischen Stress ausüben.

Das Herstellen der 12 Gradienten erfolgte durch vorsichtiges Übereinanderschichten von 15 mL PercollA und 20 mL PercollB.

Nach insgesamt 135 min Kollagenase-Behandlung der Kapillaren wurden die vereinzelt Zellen mit M199 gewaschen und bei 110 x g für 10 min in insgesamt 6 Einmalreaktionsgefäßen (50 mL) zentrifugiert. Nach dem Wiederholen des Waschschruttes wurden die Zellsuspensionen auf 3 Einmalreaktionsgefäße (50 mL) vereinigt, abermals zentrifugiert und in jeweils 40 mL Medium resuspendiert. Anschließend wurde jeder Percoll-Gradient mit 10 mL Zellsuspension beladen und ohne Bremse bei 1800 x g für 10 min zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation waren im Allgemeinen zwei Banden zu erkennen. Bei der untersten, rötlichen Bande, die auch als Sediment vorliegen kann, handelt es sich um Erythrocyten. Die andere, voluminösere, oben lokalisierte Bande war noch durch restliche Erythrocyten rötlich gefärbt.

Jeweils die obere Bande wurde isoliert und in 4 Einmalreaktionsgefäßen (50 mL) gesammelt. Es folgte das Auffüllen mit M199 auf 40 mL und die Zentrifugation der Suspension bei 110 x g für 5 min. Der Waschvorgang wurde wiederholt und die resultierenden Überstände verworfen; die Sedimente wurden anschließend vereinigt. Um die restlichen Erythrocyten zu entfernen, sind diese lysiert worden, wobei die Vitalität der Hirnkapillarendothelzellen nicht beeinträchtigt war. Das Sediment wurde in 9 mL Lysepuffer (225 µL Lysepuffer A, 900 µL Lysepuffer B, 450 µL Lysepuffer C und 21 mL *aqua bidest.*) und 4,5 mL Earle's Puffer resuspendiert und abermals zentrifugiert. Der Vorgang wurde wiederholt, das resultierende Sediment zweimal mit Medium gewaschen und schließlich mit 40 mL Medium mit Zusätzen sorgfältig und vorsichtig resuspendiert.

## 4.2 Zellkultur

Bei der Kultivierung von Zellen wird versucht, *in vitro* die *in vivo*-Bedingungen möglichst nachzubilden, um ein optimales Wachstum der Zellen zu gewährleisten. Hierbei stellt jeder Zelltyp individuelle Ansprüche an die Kulturbedingungen.

#### 4.2.1 Beschichtung der Zellkulturgefäße mit Kollagen

Die Beschichtung von Zellkulturgefäßen ist für viele kultivierte Zelltypen essentiell. Da Endothelzellen *in vivo* auf einer Basallamina wachsen, hat sich daher die Beschichtung mit Kollagen *in vitro* als geeignet erwiesen. Die Beschichtung wurde durchschnittlich 2 Tage vor Gebrauch des Materials durchgeführt. Die Beschichtung ist bei C6-Zellen aufgrund der Anspruchslosigkeit der Zellen nicht notwendig gewesen.

*Stammlösung:* Kollagen G ( $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

*Arbeitslösung:* Kollagen G ( $133 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) in MilliQ- $\text{H}_2\text{O}$

Für 6  $175 \text{ cm}^2$ -Zellkulturflaschen wurden 25 mL Arbeitslösung mit einer Pipette in eine Flasche überführt und 22,5 mL nach gleichmäßigem Verteilen der Lösung wieder entnommen. Diese wurden in die nächste Flasche gegeben und nach Verteilen der Lösung 20 mL von dieser entfernt. Das Vorgehen ist fortlaufend bei den weiteren Flaschen durchgeführt worden. Anschließend wurden die Flaschen horizontal bei  $37^\circ\text{C}$  gelagert. Bei der Beschichtung der Deckgläschen für die Mikroskopie wurden nach dem Entfernen der Arbeitslösung ca. 200  $\mu\text{L}$  der Lösung in der Kavität zurückgelassen und die 12-Lochplatten bei  $37^\circ\text{C}$  gelagert. Eventuell vorhandene Reste sind dann jeweils vor dem Gebrauch durch Absaugen entfernt worden.

#### 4.2.2 Auftauen von cryokonservierten Zellen

Durch die Cryokonservierung in flüssigem Stickstoff werden die Zellen optimal gelagert. Beim Auftauen der Zellen ist darauf zu achten, dass die Zellen keinen zu starken Temperaturschock durch zu schnelle Temperierung auf  $37^\circ\text{C}$  erleiden.

*Medium:* M199 mit Zusätzen

Die Lagerung der C6-Zellen erfolgte in Aliquots à  $3,2 \cdot 10^6$  Zellen pro 2 mL-Cryoröhrchen in flüssigem Stickstoff. Aus diesem wurden sie auf Eis ins Zellkulturlabor transportiert und in einem Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut. Umgehend nach Verschwinden der letzten Eiskristalle im Cryoröhrchen wurden die Zellen in ein 50 mL-Reaktionsgefäß in der Sterilwerkbank überführt, langsam 25 mL vortemperiertes Medium hinzugegeben und die Zellen vorsichtig resuspendiert. Nach der Zentrifugation

bei 120 x g für 5 min sind die Sedimente gegebenenfalls vereinigt und mit warmem Medium, je nach Bedarf, auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt worden. Anschließend wurden sie mit einer Dichte von etwa 7300 Zellen pro  $\text{cm}^2$  Zellkulturgefäß ausgesät. Daher wurden in die 12-Lochschalen mit Deckgläschen  $2,5 \cdot 10^4$  Zellen in einem Volumen von 1 mL, und in die 175  $\text{cm}^2$ -Zellkulturflaschen  $1,3 \cdot 10^6$  Zellen in einem Volumen von 25 mL Medium M199 mit Zusätzen eingesetzt. Die Zellkulturflaschen werden zum gleichmäßigen Verteilen der Zellen in Form einer Acht bewegt und zum Absetzen der Zellen 15 min in der Sterilbank stehen gelassen. Anschließend werden die Zellen bei 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  und 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert.

#### 4.2.3 Subkultivierung von Zellen

Bei der Subkultivierung von Zellen werden diese aus einer Zellkulturflasche durch das Enzym Trypsin in eine Suspension überführt und anschließend in verdünntem Verhältnis wieder ausgesät. Die Subkultivierung wird vorgenommen, wenn die Konfluenz der Ausgangskultur erreicht ist.

*PBS<sup>2-</sup>*

*Trypsin-Lösung:* 0,25 % (v/v) Trypsin in PBS<sup>2-</sup>

*Medium:* M199 mit Zusätzen

Die im folgenden angegebenen Volumina gelten für 175  $\text{cm}^2$ -Zellkulturflaschen und sind für Gefäße anderer Größe entsprechend zu modifizieren. Um möglichst wenig Stress auf die Zellen auszuüben, waren auf 37°C temperierte Medien und Lösungen zu verwenden.

Der Zellrasen in den Zellkulturflaschen wurde zunächst zweimal mit je 10 mL PBS<sup>2-</sup> gewaschen. Anschließend wurde in jede Flasche 7,5 mL PBS<sup>2-</sup> vorgelegt und in die aufrecht stehenden Flaschen je 2,5 mL Trypsinlösung hinzugefügt. Dann wurden die Flaschen waagrecht gestellt, wobei darauf geachtet werden muß, dass die Enzymlösung gleichmäßig den Flaschenboden bedeckt.

Nach 2 min wurden die Flaschen gegen eine Tischkante geklopft und unter dem Mikroskop das Ablösen der Zellen beobachtet. Dieser Prozess verlief bei C6-Zellen wesentlich schneller, als bei Hirnkapillarendothelzellen. Hafteten nur noch wenige einzelne Cluster an der Zellkulturflasche an, war der enzymatische Vorgang des

Ablösens durch die Zugabe von je 10 ml Medium zu unterbinden. Die Suspensionen wurden gesammelt und bei 120 x g für 10 min in einem 50 mL Reaktionsgefäß zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Sedimente mit Medium resuspendiert und vereinigt. Die Suspension wurde mit der Pipette auf- und abgezogen, bis sich auch Zellhaufen aufgelöst hatten. Je nach Teilungsverhältnis wurde die entsprechende Menge Zellsuspension zu 20 mL vorgelegtem Medium in eine neue Zellkulturflasche gegeben. Das Verhältnis der Subkultivierungen ist in Tab. 4.1 zusammengefasst. Der Quotient bezieht sich hierbei auf die jeweilige Kultivierungsfläche.

**Tab. 4.1:** Teilungsverhältnis bei Subkultivierung der einzelnen Zellpopulationen

Passage	Verhältnis
C6	1:4 oder 1:5
P0 zu P1	1:2
P1 zu P2	1:1,5

Bei der Verwendung von 12-Lochschalen (mit oder ohne Deckgläschen) wurde kein Medium in den Kavitäten vorgelegt, sondern die benötigte Menge Zellen in Medium resuspendiert und je 1 mL Zellsuspension pro Vertiefung hinein gegeben. Nach der Aussaat wurden die Zellkulturflaschen zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen in Form einer Acht bewegt und anschließend eine Viertelstunde in der Sterilbank stehend inkubiert. Die Kultivierung erfolgte wiederum im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit.

#### 4.2.4 Kultivierung der C6-Zellen

Mit C6-Zellen werden Klone von mit *N*-Nitrosomethylharnstoff induzierten Gliomas aus dem Gehirn von Ratten bezeichnet. Bei den gewonnenen Astrozyten handelt es sich um Tumorzellen mit spezifischen Eigenschaften der Gliazellen. Sie besitzen eine hohe Teilungsrate und sind einfach zu kultivieren.

Sie wurden in Passage 37 käuflich erworben, wobei Zellen aus Passagen 39-42 für die Experimente verwendet wurden. Die Subkultivierung im Verhältnis 1:4 bzw. 1:5 (s. 4.2.3) erfolgte bei Erreichen der Konfluenz, was etwa nach 3-4 Tagen der Fall war.

#### 4.2.5 Kultivierung der Hirnkapillarendothelzellen

Die nach der Präparation der Hirnkapillarendothelzellen erhaltene Suspension (s. 4.1) wurde in den kollagenierten Kulturgefäßen (s. 4.2.3) gleichmäßig verteilt. Hierzu wurden in 30 Zellkulturflaschen jeweils 20 mL auf 37°C temperiertes Medium vorgelegt und jeweils 1400 µL Zellsuspension hinzugegeben. Die Zellkulturflaschen wurden zum gleichmäßigen Verteilen der Zellen in Form einer Acht bewegt und zum Absetzen der Zellen 15 min in der Sterilbank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert.

Für die 12-Lochplatten wurden 12.6 mL Medium in einem sterilen Einmalreaktionsgefäß vorgelegt und 728 µL der präparierten Zellsuspension hinzugefügt. Anschließend wurde jeweils 1 mL der resultierenden Suspension in die Kavitäten gegeben und die Zellen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Die durchschnittlichen Kultivierungsdauern und durchgeführten Arbeiten sind in folgender Tabelle dargestellt, wobei das Passagieren erst bei Erreichen der Konfluenz durchgeführt wurde.

**Tab. 4.2:** Zeitverlauf der durchgeführten Arbeiten bei der Kultivierung von Hirnkapillarendothelzellen.

Zeitverlauf	Tätigkeit
Tag 0	Aussäen der Zellen
Tag 1	Mediumwechsel mit vorherigem Waschen
Tag 2	Ernte P0; Passage von P0 zu P1
Tag 4	Mediumwechsel
Tag 7	Passage P1 zu P2
Tag 10	Mediumwechsel
Tag 13	Ernte P2

Das Teilungsverhältnis bei der Passagierung ist in Tab. 4.1 angegeben.



## 4.2.6 Fixierung kultivierter Zellen

Um die Lokalisation der Proteine in der Zelle wiederzuspiegeln, ist es wichtig, diese zu fixieren. Als geeignetes Reagenz wird meist Formaldehyd-Lösung verwendet. Die Fixierung wird aber auch durch schnelle Dehydratisierung mittels Methanol erhalten. Anschließend wird mit einer Saccharose-Lösung das wässrige Milieu in der Zelle wieder hergestellt und so der native Zustand rekonstruiert.

*PBS<sup>2-</sup>*

*Methanol*

*Saccharose-Lösung: 30 % (w/v) Saccharose in PBS<sup>2-</sup>*

Die Zellen auf den Deckgläschen (C6 und BMEC nach 4.2.3) in den 12-Lochkavitäten wurden zunächst mit PBS<sup>2-</sup> zweimal gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit –20°C kaltem Methanol für 10 min bei RT. Nach dem Entfernen des Methanols sind die Zellen zweimal mit PBS<sup>2-</sup> gewaschen und mit der Saccharose-Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert worden. Schließlich wurde die Lösung entfernt und die Deckgläschen bei –20°C gelagert.

## 4.3 Isolation von Detergens-resistenten Membranen

[mod. nach Brown und Rose, 1992]

Sowohl aus frischem Gewebe, als auch aus kultivierten Zellen konnten die *Lipid-Rafts* isoliert werden. Die Fraktion ist in Detergens bei 4°C unlöslich und schwimmt im Saccharosegradienten auf.

<i>MES-Puffer :</i>	25	mM	MES
<i>pH 6,5</i>	150	mM	NaCl

*80% (w/v) Saccharose in MES-Puffer*

*30% (w/v) Saccharose in MES-Puffer*

*5% (w/v) Saccharose in MES-Puffer*

*2% (v/v) Triton x-100 in MES-Puffer*

*50x Complete-Mini-Inhibitor Cocktail in MES-Puffer*

Die konfluenten Zellen (s. 4.2.4 und 4.2.5) sind zunächst zweimal mit PBS<sup>2-</sup> gewaschen worden. Anschließend wurden 5 mL PBS<sup>2-</sup> pro 175 cm<sup>2</sup>-Flasche zugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber vom Gefäßboden gelöst. Die Zellsuspension wurde gesammelt und anschließend die Zellkulturflaschen noch einmal mit PBS<sup>2-</sup> gespült. Die Sedimentation der Zellen erfolgte durch Zentrifugation bei 110 x g für 10 min. Nach der Resuspendierung der Zellen in MES-Puffer wurden diese abermals sedimentiert und der resultierende Überstand verworfen.

Das so gewonnene Sediment wurde mit MES und 100 µL 50x Complete-Mini Proteaseinhibitor in einem Gesamtvolumen von 2,4 mL resuspendiert. Zur Suspension wurde anschließend das gleiche Volumen 2% (v/v) Triton X-100 in MES-Puffer hinzugegeben. Nach Inkubation für 20 min bei 4°C erfolgte der Aufschluss durch zehnmaliges Auf- und Abziehen mit einer 22G-Nadel in einer 1 mL-Spritze, 10 Stöße mit einem Dounce-Zylinder, sowie erneutes zehnmaliges Auf- und Abziehen mit einer 22G-Nadel.

Zum Rohaufschluss wurden 4,8 mL 80 % (w/v) Saccharose in MES-Puffer gegeben. Mit der resultierenden Suspension ist ein zuvor hergestellter Saccharose-Gradient vorsichtig unterschichtet worden. Zum Herstellen des Gradients sind 4,5 mL der 30%igen Saccharose-Lösung mit 2,5 mL 5 %iger Saccharose-Lösung, unter Vermeidung des Vermischens der Lösung, überschichtet worden.

Nach der Zentrifugation für 18 h bei 140.000 x g und 4°C im SW41-Rotor (Beckman) erfolgte die Isolation der Fraktionen von oben nach unten durch vorsichtiges Abziehen. Daran schloss sich die Analyse im Dot-Blot mit Anti-Caveolin-IgG (s. 4.9.3) an. Die positiven Proben wurden vereinigt, in MES-Puffer verdünnt und die unlöslichen Bestandteile für 30 min bei 90.000 x g im Ti70-Rotor (Beckman) bei 4°C sedimentiert. Das Sediment wurde in 500 µL MES-Puffer resuspendiert und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Bei der Isolierung aus Cortextgewebe sind 3 g graue Substanz, wie beschrieben, aufgeschlossen und anschließend auf 6 Saccharose-Gradienten verteilt worden. Nach Zentrifugation (s.o.) wurden die Fraktionen isoliert und immunchemisch auf Caveolin hin untersucht (s. 4.9.3).

## 4.4 Proteinbestimmung über BCA-Test

[Smith et al., 1985]

Der BCA-Test stellt eine colorimetrische Methode zur Quantifizierung des Proteingehaltes dar, welche auf der Bildung eines farbigen Komplexes von  $\text{Cu}^+$  mit Bicinchonininsäure (BCA) basiert. Bei der Farbreaktion wird die Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  durch Proteine im alkalischen Medium ausgenutzt. Die selektive Detektion der Reaktion erfolgt durch die Komplexbildung der entstandenen  $\text{Cu}^+$ -Ionen durch zwei Moleküle BCA.

Die Methode kann über einen weiten Bereich von Proteinkonzentrationen angewendet werden. Im Standard-Protokoll ist ein Bereich von  $20\text{--}2000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  bei  $37^\circ\text{C}$  innerhalb von 30 min zu messen. Im Sensitiven-Protokoll sind  $5\text{--}250\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  bei  $60^\circ\text{C}$  in der gleichen Zeit bestimmbar (Herstellerangaben).

*BCA Reagenz A* ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , BCA, Natriumtartrat in 0,1 N NaOH)

*BCA Reagenz B* (4% (w/v)  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )

*BSA Standard* (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8;  $1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) jeweils im Puffer der Probe

*50 mM n-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid in aqua bidest.*

Die Testlösung wurde durch Mischen von 50 Teilen BCA Reagenz A mit einem Teil BCA Reagenz B hergestellt. Zu 200  $\mu\text{L}$  Testlösung wurden 20  $\mu\text{L}$  Probe in 50 mM n-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid gegeben und 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Absorption wurde gegen die Referenzprobe (Lösungsmittel) bei 560 nm im Elisa-Reader gemessen. Mit der Eichgerade aus den BSA-Standards konnten die unbekannten Proteinkonzentrationen bestimmt werden.

## 4.5 Aktivitätstest Alkalische Phosphatase

Die Alkalische Phosphatase wird als Marker für Plasmamembranen angesehen und weist eine besonders hohe Aktivität im Endothel des Gehirns auf [Vorbrot, 1988]. Das Enzym katalysiert die Hydrolyse von Phosphorsäuremonoestern und kommt in einer großen Anzahl von Organismen vor.

Als Substrat wird p-Nitrophenylphosphat von der Alkalischen Phosphatase akzeptiert, das zu Phosphat und zu p-Nitrophenol hydrolysiert wird. Letzteres weist im alkalischen Milieu eine gelbe Färbung auf.

<i>AP-Puffer, pH 9,5:</i>	100	mM	Tris-HCl
	100	mM	NaCl
	5	mM	MgCl <sub>2</sub>

*Testlösung:* 1 Tablette FastpNPP in 5 ml AP-Puffer.

*50 mM n-Octyl-β-D-glucopyranosid in aqua bidest.*

Zunächst wurden die Zellen aus Passage 0 und 2 aus 12-Lochplatten ohne Deckgläschen mit n-Octyl-β-D-glucopyranosid durch Abschaben isoliert. Parallel erfolgte die Inkubation der Testlösung für 5 min bei 37°C. Die Reaktion ist durch Zugabe von 20 µL Probe und 150 µL Testlösung in einer 96-Lochplatte gestartet worden. Der Reaktionsverlauf wurde kontinuierlich in Intervallen von 30 sec bei 405 nm und 37°C gegenüber dem Probenpuffer als Referenz im ELISA-Reader verfolgt. Wobei als Proben auch die *Lipid Raft*-Präparationen (s. 4.3) von P0 und P2 verwendet wurden.

Zur Auswertung ist ausschließlich der lineare Bereich der Absorptionsänderung herangezogen worden. Die spezifische Aktivität (U·mg<sup>-1</sup>) der Alkalischen Phosphatase geht aus folgendem Zusammenhang hervor:

$$\text{spez. Akt.} \left[ \frac{U}{mg} \right] = \frac{\Delta(A) \cdot V \cdot F}{t \cdot V_0 \cdot d \cdot \varepsilon \cdot c_{\text{Prot.}}}$$

mit: ΔA = Änderung der Absorption bei 405 nm ohne Inhibitor

V = Gesamtvolumen des Ansatzes (170 µL)

F = Verdünnungsfaktor

t = Zeit in min

V<sub>0</sub> = Probenvolumen (20 µL)

d = Schichtdicke der Probe (0,3 cm)

ε = millimolarer dekadischer Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol  
bei 405 nm (18,5 L·mmol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>)

c<sub>prot.</sub> = Proteinkonzentration (mg·mL<sup>-1</sup>)

Ein Unit entspricht der Menge Enzym, welches die Umsetzung von einem µmol Substrat pro Minute unter den oben festgelegten Versuchsbedingungen katalysiert.

## 4.6 SDS-PAGE

[Laemmli, 1972]

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Größe getrennt. Sodiumdodecylsulfat (SDS,  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-O-SO}_3^- \text{Na}^+$ ) ist ein anionisches Detergens, welches fest an Proteine bindet und diese denaturiert. Dabei wird etwa ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäureresten gebunden; dies entspricht ca. 1,4 g SDS pro g Protein. Durch die Ladung des SDS wird die Eigenladung der Proteine maskiert, was in einem nahezu identischen Masse-Ladungsverhältnis aller Proteine resultiert. Bei der Probenvorbereitung wird das Aufbrechen von sekundären, tertiären und quartären Strukturelementen - die Streckung und die Solubilisierung der Proteine - durch Erhitzen auf 95°C und Zugabe disulfidbrückenspaltender Reagenzien unterstützt.

Die Trennung der Proteine erfolgt im Polyacrylamid-Gel. Die Gele werden durch radikalische Copolymerisation von Acrylamid- und *N,N'*-Methylenbisacrylamid-Monomeren in wässrigen Puffersystemen erhalten.

Die Trennung der Proteine erfolgt aufgrund des konstanten Masse-Ladungsverhältnisses allein nach der Größe der solubilisierten Proteine. Da alle Proteine idealerweise gleichförmig denaturiert sind, entspricht die Trennung nach der Größe daher einer Trennung nach der Masse.

<i>30 % Acrylamidlg:</i>	30	% (w/v)	Acrylamid
	0,8	% (w/v)	<i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid
<i>Trenngelpuffer:</i>	1,5	M	Tris-Cl
<i>pH 8,8:</i>			
<i>Sammelgelpuffer:</i>	0,5	M	Tris-Cl
<i>pH 6,8</i>			
<i>Laufpuffer:</i>	25	mM	Tris
	192	mM	Glycin
	0,1	mM	SDS

10 % (w/v) SDS

10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat

*n*-Butanol: Trenngelpuffer-gesättigt

<i>SDS-Auftragspuffer:</i>	62,5	mM	Tris-Cl
<i>pH 6,5</i>	4	% (w/v)	SDS
	20	% (v/v)	Glycerin
	5	% (v/v)	$\beta$ -Mercaptoethanol
	0.025	% (w/v)	Bromphenolblau

**Tab. 4.3:** Trenngelzusammensetzung

Acrylamid [%]	Rotiphorese 30 [mL]	Trenngelpuffer [mL]	H <sub>2</sub> O [mL]	SDS [μL]	APS [μL]	TEMED [μL]
10	4	3	4,8	120	50	3
12,5	5	3	3,8	120	50	3
15	6	3	2,8	120	50	3

**Tab. 4.4:** Sammelgelzusammensetzung

Acrylamid [%]	Rotiphorese 30 [mL]	Sammelgel- puffer [mL]	H <sub>2</sub> O [mL]	SDS [μL]	APS [μL]	TEMED [μL]
4,8	0,66	1	2,33	40	20	4

**Tab. 4.5:** Acrylamidgehalt und Zusammensetzung des Trenngels bei einem Gradientengel

Acrylamid [%]	Rotiphorese 30 [mL]	Trenngel-puffer [mL]	H <sub>2</sub> O [mL]	SDS [μL]	APS [μL]	TEMED [μL]	Sacc. [g]
7,5	0,94	0,94	1,83	37,5	30	1,5	-
12,5	1,57	0,94	0,87	37,5	16,5	1,5	0,563

Die Gele wurden jeweils zwischen zwei, über einen Abstandhalter getrennte Glasplatten, gegossen, welche vorher mit Isopropanol gereinigt wurden.

Die angegebenen Mengen des Trenngels wurden gemischt, wobei die Zugabe von TEMED und APS direkt vor dem Einfüllen in die Gelapparatur erfolgte. Die Lösung wurde bis zu 4/5 der Gesamthöhe der Glasplatten gefüllt und anschließend mit durch Trenngelpuffer-gesättigtem n-Butanol vorsichtig überschichtet. Bei einem Gradientengel sind die Gellösungen (Tab. 4.5) von einem Gradientenmischer mit einer peristaltischen Pumpe über ein Schlauchsystem zwischen die Gelplatten gepumpt worden, wobei der Polymergehalt von unten nach oben linear fällt.

Nach dem Polymerisieren des Trenngels (Dauer 30-60 min) wurde das Sammelgel bis an den oberen Rand der Glasplatten gefüllt und dann ein Kamm mit 10-12 Taschen (je nach Gelgröße) eingeschoben.

Nach dem Erstarren der Gele wurden diese entweder sofort weiter verwendet, oder in feuchte Tücher und Folie eingewickelt bei 4°C gelagert.

Zur Probenvorbereitung sind diese mit Auftragspuffer versetzt und mind. 2 min bei 95°C denaturiert und mit einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen aufgetragen worden. Von dem Proteinstandard wurden 5 μL eingesetzt. Hierbei wurde bei Gelen, die geblottet wurden, SeeBlue™ verwendet, da dieser durch farbliche Markierung nach dem Blotten direkt sichtbar war. Ansonsten fand der SilverStain-Standard Anwendung.

Bei Einlaufen der Proteine in das Sammelgel ist eine Spannung von 100 V angelegt worden, welche bei Erreichen des Trenngels auf 150 V erhöht wurde.

Der Lauf wurde bei Austritt der Bromphenolblaufront beendet und das Gel entweder geblottet (s.4.9.2) oder gefärbt (s. 4.8.1).

## 4.6.1 Färbemethode zur Visualisierung von Proteinen in Gelen

### 4.6.1.1 Coomasie Färbung

[mod. nach Burnette, 1981]

Die Coomasie-Färbung ist eine häufig durchgeführte Färbemethode von Proteinen im Gel. Der Farbstoff bindet stöchiometrisch an Proteine, wodurch die relative Menge der Proteine im Gel leicht zu bestimmen ist. Die Färbemethode ist weniger sensitiv, als die Silberfärbung, sie ist jedoch einfacher durchzuführen, da zum Beispiel Färbung und Fixierung in einem Schritt durchgeführt werden. Außerdem stellt die Methode eine Endpunktfärbung dar, und ist somit einfach zu reproduzieren.

<i>Färbelösung:</i>	0,25	% (w/v)	Coomasie Brilliant Blau R 250
	45	% (v/v)	Ethanol
	5	% (v/v)	HOAc
<i>Entfärbelösung:</i>	45	% (v/v)	Ethanol
	5	% (v/v)	HOAc

Die Polyacrylamid-Gele wurden unmittelbar nach der Elektrophorese (s. 4.8) in die Färbelösung überführt und unter Schütteln 30-60 min inkubiert. Anschließend wurden sie bis zum Sichtbarwerden der Banden unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung entfärbt und durch Scannen dokumentiert.

### 4.6.1.2 Silberfärbung

[mod. nach Blum, 1987]

Die Silberfärbung ist eine der sensitivsten Methoden zur Detektion von Proteinen in Gelen (1-5 ng pro Bande). Es existieren eine Vielzahl von Protokollen, denen gemein ist, dass die Proteine zunächst im Gel fixiert werden. Die an der Geloberfläche

befindlichen, mit reduzierenden Gruppen versehenen Aminosäureseitenketten der Proteine reduzieren Silberionen zu Silber. Diese Silberkeime werden anschließend entwickelt. Ein Nachteil der Methode besteht darin, dass sich die Reproduzierbarkeit durch die Vielzahl der Schritte schwierig gestaltet. Weiterhin ist die Färbung bei verschiedenen Proteinen gleicher Menge verschieden, da nur reduzierende Elemente des Proteins detektiert werden. Zudem ist auch die Linearität der Färbeintensität bei einem Protein in verschiedenen Konzentrationen nicht gewährleistet.

Fixierung:	50 % (v/v) 12 % (v/v)	Ethanol Essigsäure	mind. 1h
Waschen:	50 % (v/v)	Ethanol	2x 20 min
Waschen:		<i>aqua dest.</i>	30 sec
Imprägnieren:	0,02 % (w/v)	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1 min
Waschen:		<i>aqua dest.</i>	30 sec
Färben:	0,2 % (w/v) 0,05 % (v/v)	AgNO <sub>3</sub> Formaldehyd	20 min
Waschen:		<i>aqua dest.</i>	30 sec
Entwickeln:	6 % (w/v) 0,05 % (v/v)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Formaldehyd	bis zur gewünschten Färbeintensität
Waschen:		<i>aqua dest.</i>	30 sec
Abstoppen:	50 % (v/v) 12 % (v/v)	Ethanol Essigsäure	

Nach der Färbung werden die Gele dokumentiert (Scannen).

#### 4.6.1.3 Detektion von Proteinen durch SyproRuby-Färbung

Die SyproRuby-Färbung stellt eine Fluoreszenzfärbung dar, bei der der Farbstoff vermutlich über das die Proteine umgebende SDS bindet [Görg et al., 2000].

Diese Methode ist ähnlich sensitiv wie die Silberfärbung. Sie ist über einen großen Bereich linear (3 Größenordnungen) und bei verschiedenen Proteinen zu ihrer Menge proportional. Desweiteren ist eine bessere Reproduzierbarkeit gegeben, da die Methode weniger Schritte umfasst und eine Endpunktsfärbung vorliegt. Ein weiterer



Vorteil besteht in der Kompatibilität mit der Massenspektrometrie und dem Edmanabbau. Die Nachteile der Färbung liegen zum einen beim hohen Preis der Färbelösung, zum anderen bei der Notwendigkeit eines entsprechenden Geräts zur Detektion.

Der Farbstoff, der das Übergangsmetall Ruthenium enthält, besitzt ein Exitationsmaximum bei ca. 480 nm, sowie ein Emissionsmaximum bei ca. 600 nm und kann daher über einen blauen Laserstrahl angeregt werden.

Fixierung:	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) HOAc	mind. 30 min
Färben:	SyproRuby-Färbelösung	90 min bis über Nacht
Waschen:	10 % (v/v) Methanol 6 % (v/v) HOAc	30 min

Die Färbung wurde in einer speziell aus schwarzem Kunststoff gefertigten lichtdichten Schale durchgeführt. Das Waschen der Gele fand ebenfalls unter Ausschluss von Licht statt. Die Dokumentation erfolgte mit dem Laser-Fluoreszenzscanner (FLA-3000). Die Wellenlänge des Anregungslasers betrug 473 nm; der Emissionsfilter war auf einen Durchlass oberhalb von 580 nm eingestellt. Gescannt wurde mit einer Auflösung von 100 µm und einer Sensitivität von 100. Die Gele sind anschließend zur Isolierung der Proteine für die Massenspektrometrie auf einen Blautisch gelegt worden. Die jeweiligen Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein silikonisiertes Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

## 4.7 Immunchemische Methoden

### 4.7.1 Dot-Blot

Bei einem Dot-Blot können kleine Probenmengen ohne vorherige Trennung durch ein Polyacrylamidgel durch nachfolgende Immunfärbung miteinander verglichen werden. Es fanden dabei zwei Verfahren Anwendung.

*TBST-Puffer*

Bei dem ersten Verfahren ist zunächst eine Nitrocellulose-Membran auf ein Whatmann-Papier gelegt worden. Im Anschluss wurden jeweils 2 µL der isolierten Fraktionen der Lipid-Raft-Präparation aus 4.3 auf die Membran aufgetragen.

Bei dem zweiten angewendeten Verfahren wurde eine Dot-Blot-Apparatur verwendet. Die Dot-Blot-Apparatur, die in Breite, Länge und Form einer 96er Mikrotiterplatte gleicht, war mit Absaugstutzen und Schlauch an einer Wasserstrahlpumpe befestigt. Die Versuchsanordnung war sandwichartig aufzubauen, wobei von unten nach oben folgende Komponenten vorlagen: Absaugwanne, Platte mit 96 Löchern à 1 mm Durchmesser, Whatman-Papier, Nitrocellulosemembran, Platte mit 96 Löchern à 7 mm Durchmesser zum Auftragen der Probe. Bei unbenutzten Kavitäten wurde Parafilm statt Nitrocellulose verwendet.

Zunächst sind die Kavitäten einmal mit TBST-Puffer gewaschen worden. Anschließend sind gleiche Volumina aus den Fraktionen der Lipid-Raft-Isolierung aufgetragen und langsam mit einem Wasserstrahlvakuum von 400 mbar durch die Nitrocellulosemembran gesaugt worden. Bei diesem Prozess haben die Proteine an die Membran gebunden.

Die jeweiligen Membranen wurden getrocknet und wie unter 4.9.3 beschrieben immunchemisch gefärbt.

## 4.7.2 Western Blot

[Kyse-Anderson, 1984]

Bei einem Western Blot werden Proteine durch das sog. Semidry-Verfahren aus einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Als Membranmaterialien werden Nitrocellulose (0,2 µm) und PVDF (0,2 µm) angewendet, welche beide eine hohe Affinität zu Proteinen besitzen.

<i>Kathodenpuffer:</i>	25	mM	Tris
	40	mM	ε-Aminocapronsäure
	0,01	% (w/v)	SDS
	20	% (v/v)	Methanol
<i>Anodenpuffer I:</i>	300	mM	Tris
	20	% (v/v)	Methanol
<i>Anodenpuffer II:</i>	25	mM	Tris
	20	% (v/v)	Methanol
<i>Ponceau S-Lösung:</i>	0,2	% (w/v)	Ponceau S
	2	% (w/v)	TCA

Zunächst wurden die Proteine durch die SDS-Gelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt (s. 4.6). Zur Vorbereitung des Blots wurden 7 *Gelblotting paper* und die jeweilige Membran in der Größe des Trenngels ausgeschnitten. Trockene PVDF-Membran war vor allen Arbeitsschritten mit Methanol zu benetzen. Von den Papieren wurden 3 mit Kathodenpuffer und jeweils 2 mit Anodenpuffer I und II getränkt. Die Membranen wurden 10 sec in Anodenpuffer II inkubiert.

Unmittelbar nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Sammelgel entfernt, das Trenngel mit *aqua bidest.* abgespült und die einzelnen Komponenten in folgender Reihenfolge exakt auf die Apparatur von unten (Anode) nach oben (Kathode) übereinandergeschichtet: 2 x *Gelblotting paper*-Anodenpuffer I, 2 x *Gelblotting paper*-Anodenpuffer II, Membran, Polyacrylamid-Gel und 3 x *Gelblotting paper*-Kathodenpuffer.

Anschließend ist die Apparatur geschlossen und für den Proteintransfer ein Strom von  $2,5 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$  Blotfläche für 1 h angelegt worden. Hierbei sollte die Spannung einen Wert von 25 V nicht überschreiten, wobei durchschnittlich 12 V erreicht wurden.

Im Anschluss an den Transfer wurde die Membran in Poncau-S-Lösung unter leichtem Schütteln für 10 min inkubiert, wobei die Nitrocellulosemembran zunächst auf *Gelblotting paper* getrocknet wurde. Danach ist die Membran bis zum Sichtbarwerden der Banden mit *aqua dest.* entfärbt worden. Da es sich bei der Ponceau S-Färbung um einen reversiblen Prozess handelte, konnte die Färbung der Banden für eine nachfolgende Immunfärbung mit *aqua dest.* durch längere Inkubation und Wechseln der Entfärbelösung vollständig entfernt werden.

### 4.7.3 Immunchemische Färbung

[Harlow und Lane, 1988]

Bei der Immunfärbung werden einzelne Proteine auf einer Nitrocellulose- oder PVDF-Membran mit Antikörpern und einer nachfolgenden Farbreaktion spezifisch detektiert.

#### *TBST-Puffer*

*Blocklösung:* 1:10 Verdünnung von 10 x Roti-Block in *aqua bidest.*

<i>AP-Puffer:</i>	100	mM	Tris-HCl
<i>pH 9,5</i>	100	mM	NaCl
	5	mM	MgCl <sub>2</sub>

<i>Stopp-Puffer:</i> <i>pH 7,0</i>	200 5	mM mM	Tris-HCl EDTA
<i>NBT-Lösung:</i>	50 mg·ml <sup>-1</sup>		Nitro Blue Tetrazolium in 70 % (v/v) Dimethylformamid
<i>BCIP-Lösung:</i>	50 mg·ml <sup>-1</sup>		5-Brom-4-chlor-3-indolyl- phosphat in Dimethylformamid
<i>Substrat-Lösung:</i>	15 µL NBT-Lösung und 12 µL BCIP-Lösung in 20 mL AP-Puffer		
<i>Erstantikörperlösungen:</i>	Anti-(GLUT1)-IgG (Kaninchen) in TBST-Puffer 1:1.000 verdünnt  Anti-(Caveolin)-IgG (Maus) in TBST-Puffer 1:1.500 verdünnt  Anti-(BCRP)-IgG (Maus) in TBST-Puffer 1:100 verdünnt		
<i>Zweitantikörperlösung:</i>	Anti-(IgG-Kaninchen)-IgG (Ziege), mit Alkalische Phosphatase konjugiert, in TBST- Puffer 1:15.000 verdünnt  Anti-(IgG-Maus)-IgG1 (Ziege), mit Alkalische Phosphatase konjugiert, in TBST- Puffer 1:5.000 verdünnt  Anti-(IgG-Maus, whole molecule)-IgG (Ziege), mit Alkalische Phosphatase konjugiert, in TBST- Puffer 1:5.000 verdünnt		

Zunächst musste ein unspezifisches Binden der Antikörper an die Membran verhindert werden. Dazu wurden die noch verbliebenen freien Proteinbindungsstellen auf der Membran mit Blocklösung abgesättigt. Anschließend ist die Membran mit ca. 5-10 ml einer Erstantikörperlösung bei RT inkubiert worden. Nach dem Waschen erfolgte die Inkubation in gleicher Weise wie beim Erstantikörper mit einem Zweitantikörper, der gegen den Erstantikörper gerichtet ist und mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt war.

Das Enzym setzt die Substrate NBT und BCIP zu einem präzipitierenden Indigo-Farbstoff (violett) um. Das Optimum der Alkalischen Phosphatase liegt im alkalischen Milieu, weshalb die Membran vor der Substratreaktion mit AP-Puffer (pH 9,5) umgepuffert werden musste. Die Färbung wurde über einen Scanner dokumentiert. Nachfolgend sind die einzelnen Schritte nochmals tabellarisch protokolliert. Alle Schritte fanden bei Raumtemperatur auf einem Immunoschüttler statt. Die Antikörper-Inkubationen können alternativ über Nacht bei 4°C durchgeführt werden.

Waschen:	3 x 5 min	TBST-Puffer
Blocken:	30 min	Rotiblock (1x)
Waschen:	1 x 5 min	TBST-Puffer
Erstantikörper:	2 h	Erstantikörperlösung
Waschen:	3 x 5 min	TBST-Puffer
Zweitantikörper:	2 h	Zweitantikörperlösung
Waschen:	3 x 5 min	TBST-Puffer
Umpuffern:	10 min	AP-Puffer
Substratreaktion:	bis zur gewünschten Farbintensität	Substratlösung
Abstoppen:	> 10 min	Stopp-Puffer

## 4.8 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen

### 4.8.1 Partielle Hydrolyse im Gel durch Trypsin

[mod. Shevchenko et al., 1996]

Nach der Gelelektrophorese und der nachfolgenden Färbung sind die Proteine in der Gelmatrix eingebettet. Um eine Analyse der Proteine durchführen zu können, müssen diese aus der Gelmatrix herausgelöst werden. Da Peptide aufgrund ihrer Größe leichter eluieren als Proteine, wurde die jeweilige Proteinbande einer partiellen Hydrolyse durch Trypsin unterzogen. Die eluierten Peptide konnten nachfolgend im Beisein von Trypsin massenspektrometrisch untersucht werden. Das eingesetzte Trypsin aus Schwein war methyliert und mit TPCK behandelt, um die Eigenhydrolyse zu minimieren und die Aktivität zu erhalten.

*Hydrolyse-Puffer:* 50 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  in HPLC- $\text{H}_2\text{O}$

*Trypsinlösung:* 0,5  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  in 1mM HCl

*Acetonitril, 50 % (v/v)*

*Acetonitril*

*HPLC-  $\text{H}_2\text{O}$*

*1mM HCl*

Nach der Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  (s. 4.8.1.3) wurden die Gelstücke zur Vermeidung von Keratin-Kontaminationen unter dem Abzug bei RT behandelt. Die einzelnen Waschschrte sind auf einem Immunoschüttler durchgeführt worden. Um Salz- und Pufferrückstände zu entfernen, wurden die Gelstücke zunächst zweimal jeweils 20 min mit 100  $\mu\text{L}$  *aqua bidest.* gewaschen. Anschließend wurden die Gelstücke durch zweimaliges Waschen (je 20 min) mit 100  $\mu\text{L}$  50 %igem(v/v) Acetonitril zunehmend dehydratisiert. Die vollständige Dehydratisierung erfolgte mit 100  $\mu\text{L}$  Acetonitril. Nach Entfernen des Überstands wurden die geschrumpften Gelstücke getrocknet und anschließend, je nach Größe, mit 15-40  $\mu\text{L}$  Hydrolyse-Puffer und 0,5-1  $\mu\text{L}$  Trypsinlösung rehydratisiert. Hierbei sollten die Gelstücke nach der Rehydratation gerade eben mit Flüssigkeit bedeckt sein. Die Inkubation wurde nach 6 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  durch Einfrieren bei  $-80^{\circ}\text{C}$  beendet.

#### 4.8.2 Probenvorbereitung mit ZipTip™

Durch Verwendung des ZipTip-Protokolls ist es möglich, Peptide zu konzentrieren und zu entsalzen. Dies wird mit RP-Material, welches sich am Einlass einer Pipettenspitze befindet, erreicht. Das Volumen des Materials beträgt ca. 0,5-1  $\mu\text{L}$ .

*Trifluoressigsäure (TFA), 0,2 % (v/v)*

*Acetonitril, 50 % (v/v)*

*Trifluoressigsäure (TFA), 0,1 % (v/v)*

<i>Elutionslösung:</i>	60	% (v/v)	Methanol
	0,08	% (v/v)	TFA

<i>Matrix-Stammlösung:</i>	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymzimtsäure gesättigt in
	50 % (v/v) Acetonitril
	0,12 % (v/v) TFA

<i>Matrix-Arbeitslösung</i>	40	% (v/v)	Matrix-Stammlösung
	50	% (v/v)	Acetonitril
	0,12	% (v/v)	TFA

Nach der partiellen Hydrolyse der Proteine durch Trypsin (s. 4.10.1) befinden sich die Peptide vorwiegend im Gelstück und der pH-Wert liegt noch im schwach basischen Bereich, was für den nachfolgenden Reinigungsschritt nicht optimal ist. Daher wurden zu der jeweiligen Probe 20  $\mu\text{L}$  0.2% (v/v) TFA gegeben und die Suspension für 1 h auf einem Immunoschüttler oder auf einem sog. Vortexer stark geschüttelt.

Bei der Trennung der Peptide mit der nano-HPLC war unbedingt zu vermeiden, dass Polyacrylamidpartikel oder sonstige Partikel in die Anlage gelangen. Daher wurde zur Vorbereitung für die ESI-Messung die jeweilige Probe 5 min bei 20187 x g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und 35 µL des Überstandes, in dem sich nun ein Großteil der Peptide befanden in ein PCR-Mikroreaktionsgefäß überführt. Bei der MALDI-Analyse entfiel dieser Schritt.

Für das „Ziptippen“ ist ein Volumen von 8 µL an der Pipette eingestellt und anschließend zweimal durch Aufziehen von 50%igem (v/v) Acetonitril das RP-Material aktiviert worden. Im folgenden war bei allen Schritten darauf zu achten, dass keine Luft in die Pipettenspitze angesaugt wird, um eine effektive Reinigung und Anreicherung der Peptide nicht zu gefährden. Nach der Aktivierung wurde die ZipTip durch zweimaliges Aufziehen von 0.1% (v/v) TFA äquilibriert. Die Probe gelangte durch 10–20maliges Auf- und Abziehen der Flüssigkeit mit der Pipette auf das RP-Material und wurde anschließend durch zweimaliges Waschen mit 0.1% (v/v) TFA entsalzt. Schließlich erfolgte die Elution.

Für die nano-HPLC-ESI-Analyse wurden 2 µL Elutionslösung in einem PCR-Mikroreaktionsgefäß vorgelegt und die Peptide durch fünfmaliges Auf- und Abziehen der Flüssigkeit eluiert. Für die MALDI-Analyse wird mit Matrixlösung eluiert. Hierbei war ein möglichst kleines Volumen aufzuziehen, welches etwas größer sein sollte, als das des RP-Materials. Schließlich ist die Lösung mit den Peptiden direkt durch fünfmaliges Auf- und Abziehen auf den MALDI-Probenteller gegeben worden.

### 4.8.3 MALDI-Analyse

„*Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation*“ – Massenspektrometrie wird mittlerweile routinemäßig zur Massenbestimmung von Peptiden und Proteinen herangezogen.

#### 4.8.3.1 Probenvorbereitung MALDI

Für die MALDI-Analysen ist es erforderlich, eine kokristalline Schicht zwischen Analyt- und Matrixbestandteilen zu erzeugen. Dies wird durch Mischen von jeweils wässrig-organischen Lösungen erreicht. Nach Verdampfen des Lösungsmittels bleibt eine kokristalline Schicht zurück. Um ein gleichmäßiges Kristallwachstum zu erreichen,

wurde eine zu 40 % gesättigte Matrix-Lösung verwendet. Durch den relativ geringen Gehalt der Matrix wurde das Hintergrundrauschen verringert (Hauptvertiefung: T. Jaskola).

*Matrix-Stammlösung:*  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizimtsäure gesättigt in  
 50 % (v/v) Acetonitril  
 0,12 % (v/v) TFA

*Matrix-Arbeitslösung* 40 % (v/v) Matrix-Stammlösung  
 50 % (v/v) Acetonitril  
 0,12 % (v/v) TFA

*Kalibriersubstanz:* je 0,8  $\mu$ L Peptidstandard 1 und 2  
 in 17  $\mu$ L Matrix-Arbeitslösung

Zunächst war der mit 100 Positionen versehene Edelstahl-Probenteller zu reinigen und vorzubereiten. Hierzu ist er je einmal für 10 min mit Acetonitril, mit 50 % (v/v) Acetonitril und mit H<sub>2</sub>O (HPLC) überschichtet sowie mit einer Bürste gereinigt worden. Der Probenteller wurde getrocknet und die Peptide nach dem Ziptippen (s. 4.10.2) auf die jeweiligen Positionen eluiert. Anschließend wurde in einem benachbarten Feld 0,5  $\mu$ L des Standards auf den Probenteller gegeben und mit 0,5  $\mu$ L zu 40 % gesättigter  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizimtsäure in der Probenkavität gemischt. Das Trocknen der Proben vor der Messung erfolgte schließlich bei RT.

#### 4.8.3.2 MALDI-Messung und Identifizierung der Proben

Bei der Messung waren mehrere Parameter variabel einzustellen. Der beobachtete Massenbereich während der Messung erstreckte sich von 700–3000 m/z, da sich der überwiegende Teil der Peptide aus dem tryptischen Verdau in der angegebenen Spanne befand. Als Parameter war zunächst die Laserintensität zu variieren. Diese war so zu wählen, dass der Schwellenwert der Ionisation überschritten wird, jedoch die Probe nicht fragmentiert. Der Schwellenwert der Ionisation ist abhängig von der verwendeten Matrix. Weitere zu variierende Parameter sind der *Grid* und die *Delay Time*. Sie wurden so gewählt, dass die maximale Auflösung und Intensität bei ca. 1800 m/z zu finden waren.

Nach der Messung ist das Hintergrundrauschen computerunterstützt reduziert worden. Anschließend wurden die Spektren zum einen mittels externem Standard kalibriert und zum anderen intern auf die monoisotopischen Peaks der Autolysefragmente des Trypsins bzw. auf Peptide von Keratin kalibriert (Daten: s. Anhang).



Die Komplexität der Spektren erlaubte die manuelle Detektion der Peaks nach der Kalibrierung im jeweiligen Probenspektrum. Die identifizierten Peaks wurden zu einer Liste zusammengefasst, dem sog. Massenfingerprint und in eine Suchmaske eingegeben. Die Identifizierung der Proteine konnte mit Hilfe weiterer Parameter (Organismus, pI, molekulare Masse, Hydrolyseenzym und Anzahl der verfehlten Spaltstellen) über eine Datenbanksuche erfolgen.

#### 4.8.4 ESI-Analyse

Mit der ESI-Massenspektrometrie ist es möglich, sowohl die Masse von Peptiden, als auch deren Sequenz zu bestimmen. Gekoppelt an eine nano-HPLC mit geringer Flussrate ( $200 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) können Peptidgemische in geringer Konzentration effektiv getrennt und analysiert werden.

##### 4.8.4.1 Kalibrierung des ESI-Gerätes

<i>Kalibrier-Lsg.- ESI:</i>		Peptid (ALILTLVS), CsCl
50	% (v/v)	Methanol
0,1	% (v/v)	Ameisensäure

Um die hohe Massengenauigkeit des *Electrospray*-Massenspektrometers ausnutzen zu können ist eine regelmäßige Kalibrierung erforderlich, die daher vor jedem zweiten Messtag erfolgte. Hierzu ist eine Referenzsubstanz verwendet worden, welche zum einen aus CsCl ( $M(\text{Cs}^+)$ : 132,9094 m/z) und zum anderen aus einem Peptid ( $M(\text{NH}_3^+ \text{-ALILTLVS-COOH})$ = 829,5393 m/z) besteht. Diese Lösung mußte in eine Glaskapillare pipettiert werden, die zu einer extrem feinen Spitze ausgezogen und auf der Außenseite mit Metall bedampft ist (MEDIUM). Anschließend wurde die Nadel in die *Nanospray*-Quelle eingespannt und über zwei Kameras die Ausrichtung zum Einlass des ESIs hin überprüft. Über eine Spritze konnte ein Druck in der Nadel aufgebaut werden, wobei über 2 Bildschirme beobachtet wurde, ob Flüssigkeit aus der Spitze der Kapillare austrat. War dies nicht der Fall, musste die Spitze vorsichtig abgebrochen werden.

Zum Messen der Kalibriersubstanz war eine Spannung von 800V an die Nadel anzulegen. Da das *Ionenspray* nicht immer zu erkennen war, konnte der Ionenstrom anhand des TIC (Gesamtionenstrom) durch das Massenspektrometer detektiert

werden. In einem Massenbereich von 100 – 1600 m/z wurde 5 min gemessen und das Gerät aufgrund der erhaltenen Referenzpeaks im sog. *Time-of-flight-Modus* (TOF) kalibriert. Für den MS/MS-Modus ist als Mutterion das Peptid  $\text{NH}_3^+$ -ALILTLVS-COOH ausgewählt und dieses mit einer *Collision Energy* (CE) von 36 mV fragmentiert worden. Die Kalibrierung erfolgte über das Mutterion und das  $b_3$ -Fragmention ( $m/b_3\text{ion}$ )=298,2131 m/z).

#### 4.8.4.2 nano-HPLC-ESI

*Trifluoressigsäure (TFA), 0,1 % (v/v)*

<i>Puffer A:</i>	0,05	% (v/v)	Ameisensäure (FA)
<i>Puffer B:</i>	80	% (v/v)	Acetonitril
	0,05	% (v/v)	Ameisensäure (FA)

*Peptidstandard, HPLC:* Bradykinin, Bradykinin 1-5, [Arg8] Vasopressin, Leu-Enkephalin, Met-Enkephalin, LHRH, Oxytocin, Substanz P, Bombesin; je 50 pmol·L<sup>-1</sup> in HPLC-H<sub>2</sub>O

Das HPLC-System besteht aus drei Komponenten, die mit Leitungen aus *fused silica* und über einen Steuercomputer miteinander verbunden sind. Die einzelnen Komponenten sind der automatische Probennehmer (Famos<sup>TM</sup>), die Ventileinheit mit Lösungsmitteln für die Vorsäule (Switchos<sup>TM</sup>) und die Haupteinheit mit UV-Detektor und Pumpsystem für die Hauptsäule (Ultimate<sup>TM</sup>).

Für die HPLC sind ausschließlich analysenreine LM verwendet worden, welche konstant mit Helium begast wurden. Nach Erneuerung eines Lösungsmittels mussten die Pumpen zunächst 10 min gespült werden, bis keine Luftblasen im Ausfluss mehr zu erkennen waren.

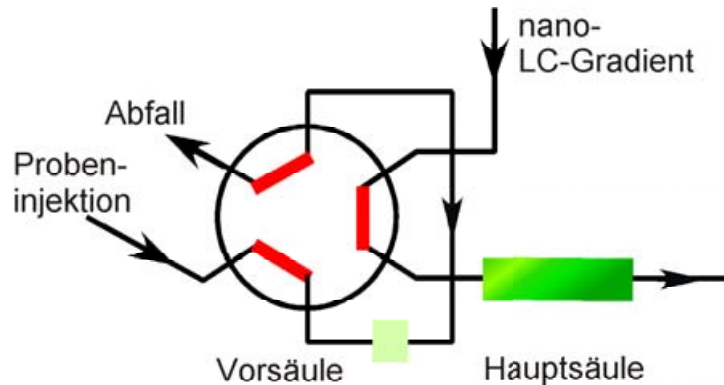
Bei Leitungsverbindungen stießen die Kapillaren in einem passgenauen Teflonschlauch aufeinander. An den Pump- und Ventilanschlüssen waren die Kapillaren über Schrauben und sog. Peeksleeve-Verbindungen angeschlossen. Bei allen Verbindungen waren Totvolumina unbedingt zu vermeiden.

Sowohl Haupt-, als auch Vorsäule besaßen als feste Phase *Pepmap<sup>TM</sup> RP-C18*-Material. Die Hauptsäule hatte einen Innendurchmesser von 0,75 µm bei einer Länge von 15 cm. Die Vorsäule wurde mit 30 µL·min<sup>-1</sup> und 0,1 % TFA, die Hauptsäule mit 100 nL·min<sup>-1</sup> und 40 % (v/v) Acetonitril, 0,05 % (v/v) FA zwischen den Messungen durchflossen. Das Mischungsverhältnis und der Fluss wurden über die Pumpen gesteuert.

Während der Messung wurde mit der Hauptpumpe ein Fluss von ca.  $150 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  eingestellt; auf der Trennsäule lag ein Fluss von  $200 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$  an. Dies wurde durch sog. *Flowsplitter* und einem Kalibrator erreicht. Der Fluss über die Hauptsäule wurde wöchentlich mit einer Hamiltonspritze, welche am Leitungssystem mit einem Teflonstück verbunden war, kontrolliert. Bei Abweichungen konnte der sog. *CRP-Value* entsprechend verändert werden, so dass ein Fluss von  $200 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$  im Kapillarsystem vorlag.

Die Trennleistung der Säule wurde täglich durch die Verwendung eines Standardpeptidgemisches überprüft. Hierzu wurde ein Gemisch aus neun Peptiden verwendet, welche in einer Stammlösung mit einer Konzentration von ca.  $50 \text{ pmol}$  pro Peptide vorlagen. Diese Stammlösung ist zur Verwendung schließlich 1:1000 in 0.1% (v/v) TFA verdünnt und mit dem automatischen Probennehmer in das System injiziert worden.

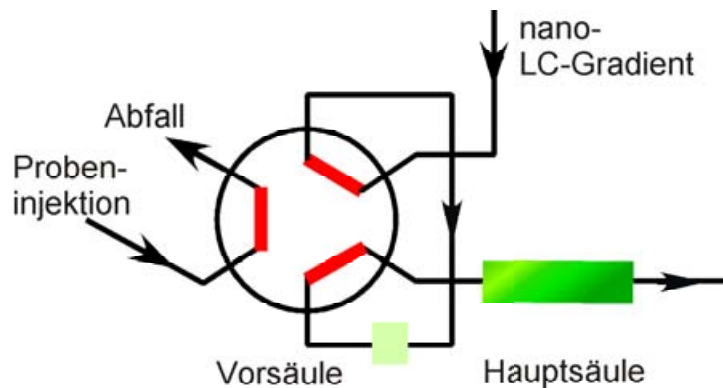
Bei einer Messung wurden die Proben resultierend aus 4.10.2 bzw. der Peptidstandard über eine Edelstahlkapillare aus einem spitz zulaufenden Probengefäß aufgezogen und anschließend auf die Vorsäule (Abb. 4.1) gepumpt. Bei einem Fluss von  $30 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  und 0,1 % TFA über 4 min banden die Peptide an das Säulenmaterial und wurden durch die mobile Phase entsalzt.



**Abb. 4.1:** Schema für die Ventilschaltung für das Beladen der Vorsäule

Anschließend schaltete das Ventil automatisch um (Abb. 4.2) und innerhalb von 30 min eluierten über einen linearen Acetonitril-Gradienten bis auf 40% (v/v) Acetonitril und 0.05% (v/v) FA die an der Vorsäule gebundenen Peptide. Diese wurden dann über die Hauptsäule getrennt. Nach einem einminütigen Gradienten auf 76% (v/v) Acetonitril und 0.05% (v/v) FA wurde dieser für 4 min gehalten, um evtl. vorhandene Rückstände von der Säule zu spülen. Anschließend folgte ein Gradient auf 4 % (v/v) Acetonitril und 0.05% (v/v) FA, welcher für 19 min beibehalten wurde, um die Säulen zu äquilibrieren. Während des Laufes schwankte der Druck der Hauptsäule bedingt durch den LM-

Gradient zwischen 130 und 90 bar und war damit mind. 20 bar höher, als der Druck des Pumpsystems. Die eluierten Peptide konnten mit einer integrierten NAN 3nl-UV-Messzelle bei 214 nm und dem direkt gekoppelten ESI (s. 4.10.4.2) detektiert werden.



**Abb. 4.2:** Schema der Ventilschaltung für die Trennung der Peptide über Hauptsäule nach Elution von der Vorsäule

#### 4.8.4.2 Aufnahme und Auswertung der Daten

Nach dem Starten eines HPLC-Laufes war auch die Aufnahme des Ionenstroms am ESI zu starten. Bei der Messung mit gekoppelter HPLC mußte ein anderer Typ von Nadel zur Erzeugung des *Nanosprays* verwendet werden (Pico Tip). Die Nadel war hierbei über ein Teflonstück an das Leitungssystem nach dem UV-Detektor der ULTIMATE™-Komponente verbunden. Die Spannung betrug an der beschichteten Kapillare 1900-2100 V.

Über die Software konnten für die Experimente die Messparameter bestimmt werden. So ist über den Zeitraum von einer Stunde jede Sekunde ein MS-Spektrum aufgenommen worden. Das Gerät schaltete automatisch in den MS/MS-Modus um, wenn ein oder zwei Peaks eine Intensität von 5 cps oder größer besaßen, mindestens zweifach geladen waren und ein  $m/z \geq 400$  besaßen.

Aufgrund der Komplexität und Vielzahl der Daten konnte die Auswertung zunächst nur automatisch erfolgen. Hierzu stellte die Software Peaklisten der MS- und MS/MS-Experimente auf und verknüpfte diese miteinander. Anschließend erfolgte die Eingabe der Peakliste in zwei unterschiedliche Suchmasken (MASCOT und Pepsearch). Daneben sind Parameter wie Oxidation von Methionin und Massenabweichung festgelegt und schließlich eine Suche in der NCBI-Datenbank durchgeführt worden.

Die Ergebnisse der Datenbankrecherche mußten im Anschluss manuell mit den experimentellen Daten abgeglichen werden. Als positiv identifiziert wurden nur solche Proteine eingestuft, welche von mindestens zwei erkannten Peptiden abgedeckt wurden. Außerdem sollte mit beiden Suchmasken das gleiche Resultat erhalten werden.

## 4.9 Immunhistochemie

Mit der Immunhistochemie können nach dem Fixieren der Zellen mittels Antikörper die subzellulären Lokalisationen von Proteinen bestimmt werden. Zur Detektion der Erstantikörper können fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Zweitantikörper verwendet werden.

### *PBS<sup>2-</sup>*

<i>Blocklösung:</i>	3	% (w/v)	BSA
	0,1	% (v/v)	Triton X-100
			in PBS <sup>2-</sup>

<i>Ak-Lösung:</i>	0,1	% (w/v)	BSA
	0,003	% (v/v)	Triton X-100
			in PBS <sup>2-</sup>

### *Erstantikörperlösungen:*

Anti-(GLUT1)-IgG (Kaninchen)  
in Ak-Lösung 1:1.000 verdünnt

Anti-(ZO1)-IgG (Ratte9  
in Ak-Lösung 1:1.000 verdünnt

Anti-(Caveolin)-IgG1 (Maus)  
in Ak-Lösung 1:250 verdünnt

### *Zweitantikörperlösungen:*

Anti-(Kaninchen-IgG)-IgG (Ziege) mit Cy3  
konjugiert in Ak-Lösung 1:250 verdünnt

Anti-(Ratte-IgG)-IgG (Ziege) mit Cy3  
konjugiert in Ak-Lösung 1:250 verdünnt

Anti-(Maus-IgG1)-IgG (Ziege) mit Cy2  
konjugiert in Ak-Lösung 1:250 verdünnt

*DAPI-Stammlösung:* 2 mg·mL<sup>-1</sup> DAPI in Methanol

*DAPI-Arbeitslösung :* 0,4 µg·mL<sup>-1</sup> DAPI in *aqua bidest*

*Kaiser's Glyceringelatine**Immersionsöl*

Die Immunfärbung ist in 12-Lochschalen mit auf Deckgläschen fixierten Zellen (s. 4.2.6) durchgeführt worden. Die einzelnen Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur auf einem Immunoschüttler. Das Volumen der jeweiligen Lösung pro Kavität betrug jeweils 300 µL.

Blocken:	30 min	Blocklösung
Erstantikörper:	30 min	Erstantikörperlösung
Waschen:	3 x 5 min	PBS <sup>2-</sup>
Die weiteren Schritte erfolgten zur Vermeidung des Ausbleichens der Fluoreszenzfarbstoffe im Dunkeln		
Zweitantikörper:	30 min	Zweitantikörperlösung
Waschen:	1 x 5 min	PBS <sup>2-</sup>
DAPI:	2 min	DAPI-Arbeitslösung
Waschen:	1 x 10 sec	PBS <sup>2-</sup>
Waschen:	1 x 5 min	PBS <sup>2-</sup>
Waschen:	1 x 5 min	<i>aqua bidest.</i>

Anschließend wurden die Deckgläschen bei 37°C getrocknet und mit 2 µL Kaiser's Glyceringelatine auf einem Objektträger fixiert. Die mit Zellen bewachsene Seite des Deckgläschens war hierbei auf den Objektträger aufzubringen.

Nach dem Verfestigen der Gelatine bei RT konnten die gefärbten Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop oder dem konfokalen Lasermikroskop untersucht werden.

Bei der Färbung von fixierten Gehirn-Schnitten (P.Gruhn) wurde analog vorgegangen.

Die Schnitte hatten eine Dicke von etwa 10 µm.

## 4.10 Molekularbiologische Methoden

### 4.10.1 Bakterienkulturen

#### 4.10.1.1 Flüssigkulturen

*Medium:* LB- oder 2xYT-Medium

*Ampicillin-Stammlösung:* 100 mg·ml<sup>-1</sup> Ampicillin, in sterilem *aqua bidest.*

*Tetracyclin-Stammlösung:* 20 mg·ml<sup>-1</sup> Tetracyclin in sterilem 50 % (v/v) Glycerin

In einem sterilen 13 mL-Kulturröhrchen sind 5 mL des benötigten Mediums, je nach verwendetem *E. coli*-Bakterienstamm, mit oder ohne Antibiotikum versehen worden. Das Animpfen wurde mit einem sterilen Zahnstocher oder einer sterilen Pipettenspitze von einer Agar-Platte (s. 4.12.1.2) aus durchgeführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht unter Schütteln bei 37°C.

#### 4.10.1.2 Plattenkulturen

*Medium-Agar:* LB- oder 2xYT-Medium-Agar

*Ampicillin-Stammlösung:* 100 mg·ml<sup>-1</sup> Ampicillin in sterilem *aqua bidest.*

*Tetracyclin-Stammlösung:* 20 mg·ml<sup>-1</sup> Tetracyclin in sterilem 50 % (v/v) Glycerin

Zum Giessen der Agarplatten wurden sterile Petrischalen verwendet. Bei Bedarf eines Antibiotikums wurde dieses erst unmittelbar vor dem Giessen der Platten, nach Abkühlen des Agars in entsprechender Konzentration hinzugefügt.

Zum Ausplattieren von Bakterien sind pro Platte dann 5-50 µL der jeweiligen Flüssigkultur ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert worden.

### 4.10.1.3 Anlegen von Dauerkulturen

#### *LB-Medium*

80 % (v/v) *Glycerin* in sterilem *aqua bidest.*

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien-Flüssigkulturen wurden 800 µl Bakteriensuspension in einem sterilen 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 400 µl sterilem *Glycerin* in LB-Medium gemischt und anschließend bei –80°C gelagert.

## 4.10.2 Transformation von DNA in Bakterien

### 4.10.2.1 Elektrokompetente Zellen

Damit Plasmide in Bakterien gelangen können, müssen diese dafür vorbereitet werden, d.h. kompetent gemacht werden.

#### *2x YT-Medium*

*aqua bidest.*, steril

10 % (v/v) *Glycerin*

In 2 L Medium sind 2 mL einer frischen Übernacht-Kultur (s. 4.10.1.1) gegeben und die resultierende Suspension in 2 Schikanekolben unter Schütteln bei 37°C inkubiert worden.

Nach Erreichen einer Dichte von  $OD_{600} = 0,6$  wurde die Flüssigkultur in Zentrifugenbecher (GSA) aufgeteilt und 30 min auf Eis inkubiert. Daran schloss sich eine Zentrifugation bei 8000 x g für 20 min und 4°C an. Das Sediment wurde im Kühlraum vorsichtig in eiskaltem, sterilem *aqua bidest.* resuspendiert und abermals bei 8000 x g und 4°C für 20 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit dem halben Volumen an H<sub>2</sub>O nochmals wiederholt und die Sedimente sind schließlich nach Resuspendierung mit 50 mL eiskaltem 10 %igen (v/v) *Glycerin* in zwei Zentrifugenbechern (SS34) vereinigt worden. Nach der Zentrifugation für 15 min bei 8000 x g und 4°C wurden die resultierenden Überstände verworfen und die Sedimente in 3 mL eiskaltem 10 %igen (v/v) *Glycerin* resuspendiert. Die Suspension wurde in Aliquots à 50 µL aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.



#### *4.10.2.2 Restriktion von DNA-Fragmenten*

Die Restriktion von DNA-Fragmenten bzw. PCR-Produkten wurde mit dem jeweiligen Restriktionsenzym im 1× Puffer des Herstellers durchgeführt. Es wurden ca. 5-10 U Enzym/μg DNA eingesetzt. Die Restriktion wurde bei der optimalen Hydrolysetemperatur des jeweiligen Enzyms durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 1 h bis über Nacht.

Bei Doppelrestriktionen musste darauf geachtet werden, ob der verwendete Puffer die Bedingungen für alle benutzten Enzyme erfüllt. Die Restriktion wurde mittels Agarosegel auf ihren Erfolg hin überprüft.

#### *4.10.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten*

Bei der Ligation von Produkten die zuvor einer Restriktion unterzogen wurden, musste zunächst das Produkt über die Gelelektrophorese (4.10.8.1) von den unerwünschten Fragmenten getrennt werden. Es folgte eine Gelelution (4.10.3.3) und eine Konzentrationsbestimmung (4.10.4) der eluierten und gewünschten DNA.

Anschließend erfolgte die Ligation mit T4-Ligase und Puffer (Promega) bei 14°C für 12-16 h. Das molekulare Verhältnis des Vektors zum verwendeten Insert sollte dabei 1:3 betragen (sticky ends des Ligationspartners).

Für die Ligation von PCR-Produkten ist das pGEM-Teasy-System der Firma Promega verwendet worden. Bei diesem Vektor handelt es sich um ein modifiziertes Plasmid, das neben einer Multiple Cloning Site noch eine Ampicillin-Resistenz besitzt.

Der pGEM-Teasy-Vektor liegt als linearisiertes Plasmid mit T-Überhängen an den 3'-Enden vor. Diese Enden sind komplementär zu den 5'-Enden von PCR-Produkten, die mit normalen Taq-Polymerasen erzeugt werden. Durch die im Ansatz enthaltene T4-DNA-Ligase wurden die komplementären Enden miteinander verbunden. Verwendet wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer, wobei die Menge des gereinigten PCR-Produktes (s. 4.12.4) zwischen 1-3 μl variierte (~50ng Vektor). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 14°C.

#### 4.10.2.4 Transformation elektrokompetenter Zellen

Bei der Elektroporation werden durch einen hohen Spannungsimpuls die DNA-Moleküle in die Bakterien eingebracht.

*IPTG-Stammlsg.:* 100 mM IPTG in sterilem *aqua bidest.*

*X-Gal-Stammlsg.:* 100 mM X-Gal in *N,N'*-Dimethylformamid

<i>SOC-Medium.</i>	2	% (w/v)	Casein
<i>pH 7,2</i>	0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
	10	mM	NaCl
	2,5	mM	KCl
	Nach dem Autoklavieren zusetzen:		
	5	mM	MgCl <sub>2</sub>
	5	mM	MgSO <sub>4</sub>

Zunächst wurde die Elektroporationsküvette auf Eis gekühlt und das SOC-Medium auf 37°C erwärmt. Zudem sind für das Ausplattieren LB-Amp-Agar-Platten mit jeweils 40 µl IPTG- und X-Gal-Stammlösung versetzt und getrocknet worden. Die elektrokompetenten *E. coli*-Zellen (s.4.10.2.1) wurden direkt vor der Transformation auf Eis aufgetaut.

Die aufgetauten Zellen wurden mit 2 µL (~5 ng DNA) des Ligationsansatzes (s. 4.10.2.3) versetzt, vorsichtig gemischt und für 1 min auf Eis inkubiert. Nach der Überführung der Zellen in die Elektroporationsküvette und Entfernen des Kondenswassers an den Kontakten der Elektrode erfolgte der Elektropuls (2,5 kV für 5-6 ms). Sofort nach dem Puls wurden pro Ansatz 1 mL SOC-Medium in die Küvette zugegeben. Mit Hilfe einer sterilen Impföse wurden 5 µL, 50 µL und die restliche Menge der Zellen auf Agarplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht im Brutraum.

Alle positiven Klone mit Insert im transformierten Plasmid waren am nächsten Tag weiß, die negativen (ohne Insert) blau gefärbt.

Bei der *Phage Display*-Bank wurde keine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt.

### 4.10.3 Isolierung von Nukleinsäuren

#### 4.10.3.1 Plasmidisolierung

Zur Isolierung der Plasmide wurde eine Flüssigkultur in LB-Amp-Flüssigmedium angelegt. Bei der Isolierung wurden die Puffer und das Protokoll des Herstellers angewendet. Prinzipiell handelt es sich bei dem Protokoll um eine alkalische Lyse der Bakterien unter Zugabe von SDS und anschließender Fällung der unlöslichen Bestandteile mit Kaliumacetat.

##### *QIAprep® Miniprep-System*

Von einer Übernachtskultur (s. 4.12.1.1) sind 1,5 mL in ein steriles 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 16.000 x g sedimentiert worden. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 250 µL kaltem P1-Puffer resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien war die Zugabe von 250 µL P2-Puffer erforderlich, wobei die resultierende Suspension vorsichtig zu invertieren und dann 5 min zu inkubieren war. Anschließend erfolgte die Zugabe von 350 µL P3-Puffer abermaliges Invertieren, sowie die Inkubation für 10 min auf Eis. Die Abtrennung der chromosomalen DNA, sowie der Zelltrümmer erfolgte durch zehnminütiges Zentrifugieren bei 16.000 x g. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand auf eine QIAprep-Säule überführt. Die Säule wurde auf ein 2 ml-Auffanggefäß gesetzt und für eine Minute bei 16.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss ist verworfen und die Säule zur Entfernung restlicher Proteinbestandteile mit 500 µL PB-Puffer gewaschen und wieder für 30 sec zentrifugiert worden. Danach wurde mit 750 µL PE-Puffer gewaschen und nach dem Zentrifugieren der Durchfluss verworfen. Nach nochmaligem Zentrifugieren bei 16.000 x g für 1 min wurden 20 µL HPLC-H<sub>2</sub>O auf die Säule aufgetragen und für 1 min bei RT inkubiert. Die Säule wurde auf ein steriles 1,5 mL-Reaktionsgefäß gesetzt und bei 16.000 x g für 1 min zentrifugiert. Von der erhaltenen Plasmid-DNA wurde die Konzentration (s. 4.12.5) bestimmt und erstere bei -20°C gelagert.

#### 4.10.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Gefahr der enzymatischen Hydrolyse der RNA wurde durch Verwendung von DEPC-behandeltem Wasser in allen Puffern umgangen. Zudem wurden alle Mehrweggegenstände bei 150°C über Nacht sterilisiert.

*TRIzol*

*Chloroform*

*Isopropanol*

*0,01 % (w/v) DEPC in aqua bidest., 2 x autoklaviert*

Bei der Isolierung wurde das Protokoll des Herstellers (TRIzol) angewendet. In eine Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) (s. 4.2.4 und 4.2.5) wurden 5 mL TRIzol gegeben und mit der Pipette die Zellen resuspendiert. Der Zellaufschluss ist 5 min bei RT inkubiert worden. Anschließend wurden 0,2 ml Chloroform pro 1 mL ursprünglich eingesetztem TRIzol zugegeben und das resultierende Phasengemisch wurde in einem 15 mL Einmal-Reaktionsgefäß geschüttelt. Nach 2 min bei RT wurde zur Phasenseparierung 10 min bei 4.000 rpm (Megafuge, Heraeus) zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches 15 mL Einmal-Reaktionsgefäß überführt. Danach ist die DNA aus der wässrigen Phase gefällt worden. Hierzu erfolgte die Zugabe von 0,5 mL Isopropanol pro mL eingesetztem TRIzol zum Überstand. Das Ganze wurde gut durchmischt und 10 min bei RT inkubiert. Während der folgenden Zentrifugation sedimentierte bei 4000 rpm (Megafuge, Heraeus) für 10 min die RNA. Das Sediment wurde zweimal mit 75 % (v/v) EtOH/DEPC-H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Die getrocknete RNA ist in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und die Konzentration (s. 4.12.5) spektral-photometrisch bestimmt worden. Zusätzlich wurde die Qualität der Präparation über ein analytisches, denaturierendes Agarosegel (s. 4.12.8.2) anhand der ribosomalen RNA bestimmt. Die RNA wurde bis zum Gebrauch bei –80°C gelagert.

#### 4.10.3.3 Gelelution

Bei der Gelelution soll DNA aus einem Agarose-Gel (4.10.8) extrahiert und gereinigt werden. Dafür wurde das MiniElute Gel Extraction-Protokoll verwendet. Laut Herstellerangaben kann dabei DNA von einer Größe zwischen 70 bp und 4 kb isoliert werden.

Die gewünschte DNA-Bande wurde mit einem scharfen, sauberen Skalpell ausgeschnitten und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Gewicht des Gelstückes wurde bestimmt und das 3fache Volumen Puffer QG zugegeben. Anschließend wurde im Heizblock bei 50°C 10 min inkubiert bis sich das Gelstück in dem harnstoffhaltigen Puffer aufgelöst hatte.

Zu der Lösung wurde das 1fache Gelvolumen Isopropanol gegeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Das Gemisch wurde auf die Säule aufgetragen und für 1 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Dabei bindet die DNA an die Membran. Das Eluat wurde verworfen und 500 µl Puffer QG auf die Säule aufgetragen. Dann wurde erneut 1 min bei 20.000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um die DNA zu waschen wurden 750 µl PE-Puffer zugegeben, wieder 1 min bei 20.000 x g zentrifugiert und anschließend die Säule bei 20.000 x g trocken zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesetzt und die DNA mit 10 µl HPLC-H<sub>2</sub>O eluiert. Nach nochmaligem Zentrifugieren für 1 min bei 13000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge) wurde die Elution auf einem Agarose-Gel überprüft und die DNA bei -20°C gelagert.

#### 4.10.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde ein UV/VIS-Spektrometer mit einer Quartz-Küvette (Volumen = 100 µL) verwendet. Hierbei ergibt sich die Quantifizierbarkeit näherungsweise aus folgendem Zusammenhang:

$$1,0 A_{260}\text{-Einheit} = 50 \mu\text{g/ml dsDNA} = 40 \mu\text{g/ml RNA}$$

Außerdem gibt das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm den Grad der Reinheit der Nukleinsäure wieder. Bei einer reinen Präparation aus DNA/RNA sollte der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Sind die Werte höher, oder niedriger, liegen Verunreinigungen durch Proteine oder niedermolekulare Substanzen wie Phenol vor.

## 4.10.5 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

### 4.10.5.1 Standard-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur exponentiellen Amplifikation von Nukleinsäuren. Die PCR macht sich die Eigenschaft von DNA-Polymerasen zunutze, DNA zu duplizieren. Dabei werden zwei Oligonukleotide (ca. 20 Nukleotide), sog. Primer, benötigt, die jeweils komplementär homolog zu den Enden der zu amplifizierenden DNA-Region sind. Die Primer müssen so orientiert sein, dass bei der Synthese der DNA-Moleküle diese aufeinander zulaufen.

Nach der Hitze-Denaturierung der DNA bei 94°C können sich die Primer bei der anschließenden Abkühlung des Reaktionsansatzes an die DNA-Matrize anlagern (Annealing). Die hitzestabile *Taq*-Polymerase erstellt, ausgehend vom 3'-OH-Ende des Primers, durch Primer-Verlängerung eine Kopie der DNA-Matrize. Nachdem die gewünschte Sequenz synthetisiert ist, werden die Stränge durch Hitzeeinwirkung denaturiert. Durch erneute Senkung der Temperatur wird eine spezifische Bindung der Primer an die entstandenen DNA-Fragmente ermöglicht. Durch ca. vierzigfaches Wiederholen dieses Zyklus wird eine bis zu  $10^{12}$ -fache Vermehrung des definierten DNA-Bereiches zwischen den Primern erreicht.

Nachfolgend sind die Mengen und das Programm einer PCR-Reaktion angegeben. Diese Parameter wurden je nach Vorgabe und Fragestellung leicht variiert. Um Pipettierfehler zu minimieren, wurde bei mehreren, gleichzeitig durchzuführenden Reaktionen ein sog. Pre-mix hergestellt, bei dem, bis auf die Matrize und die Primer, alle Substanzen vorher zusammengemischt wurden,

Ansatz für eine Reaktion:

2,0	μL	10× PCR-Puffer (mit MgCl <sub>2</sub> , [1,5 mM])
0,4	μL	10 mM dNTPs
0,8	μL	10 pmol/μL Primer A
0,8	μL	10 pmol/μL Primer B
0,1	μL	5 U/μL <i>Taq</i> -Polymerase (5 U·μL <sup>-1</sup> )
x	μL	DNA-Matrize
ad 20	μL	HPLC-H <sub>2</sub> O

PCR-Programm:

Schritt	Temp [°C]	Zeit [min]	Bezeichnung
1	95	0,5 - 15	Denaturierung
2	95	0,25	Denaturierung
3	54-60	0,5	Anealing
4	72	0,5	Extension
5	8	$\infty$	Abstoppen

Die Schritte 2 bis 4 wurden 30-40 mal wiederholt (30-40 Zyklen). Die Länge des ersten Denaturierungsschrittes richtete sich nach der Art der verwendeten *Taq*-Polymerase. Bei Polymerasen, bei denen das aktive Zentrum zur Vermeidung eines unspezifischen Schreibvorganges vor Start des PCR-Programmes mit einem Antikörper blockiert ist, erfolgte eine längere Denaturierungszeit von 15 min. Die Produkte der PCR-Reaktion wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (s. 4.12.8.1) analysiert.

#### 4.10.5.2 cDNA-Synthese über Reverse Transkription-PCR

Die cDNA entsteht durch die Reverse Transkription von RNA. Für die Synthese der komplementären DNA (cDNA) wurde eine modifizierte Reverse Transkriptase aus dem *Moloney Murine Leukemia Virus* verwendet. Dabei handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase.

Da bei den nachfolgenden Schritten die Anwesenheit von genomischer DNA extrem stören würde, ist eine DNA-Hydrolyse vor der cDNA-Synthese durchgeführt worden. Hierbei wurden 5 µg RNA in 5 µL DEPC-H<sub>2</sub>O eingesetzt.

DNase I-Hydrolyse:

2,5	µL	10× DNase-Puffer
5	µL	Gesamt-RNA
2,5	µL	1 U·µl <sup>-1</sup> DNase I
15	µL	DEPC-H <sub>2</sub> O

Die Reaktion wurde 15 min bei 25°C inkubiert und durch die Zugabe von 2,5 µL 25 mM EDTA und Inkubation bei 65°C für 15 min zur Inaktivierung der DNase I abgestoppt. Anschließend wurden für die Synthese des Erst-Stranges zunächst die Primer und die dNTPs zugegeben. Zwischen den nachfolgenden Schritten war die Probe stets auf Eis zu lagern. Zunächst erfolgte die Denaturierung bei 65°C für 5 min.

*Reverse Transkription:*  
(Denaturierung)

25	μL	DNase I-Hydrolyse-Ansatz
8	μL	0,5 μg·μL <sup>-1</sup> Random Primer
3	μL	10 mM dNTPs
2	μL	DEPC-H <sub>2</sub> O

Im Anschluss an die Denaturierung wurde die Probe umgehend auf Eis gestellt und der Erst-Strang-Puffer sowie DTT und RNaseOUT hinzugegeben.

*Reverse Transkription:*  
(Primeranlagerung)

10	μL	5× Erst-Strang-Puffer
6	μL	0,1 M DTT
3	μL	40 U·μL <sup>-1</sup> RNaseOUT

Der Ansatz wurde gut gemischt, kurz zentrifugiert und zum Anlagern der Primer für 10 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion für 2 min bei 42°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 3 μL SuperScript II Reverse Transcriptase (50 U·μL<sup>-1</sup>) worauf die Reaktion weitere 50 min inkubiert wurde. Die Deaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte durch die Inkubation für 15 min bei 70°C.

Die nicht umgesetzte RNA wurde durch die Zugabe von 3 μL RNase H (2 U·μL<sup>-1</sup>) und Inkubation bei 37°C für 20 min abgebaut. Im Anschluss daran sind noch 37 μL HPLC-H<sub>2</sub>O hinzugegeben und die synthetisierte cDNA bei -80°C gelagert worden.

Um den Erfolg der Synthese abschätzen zu können, wurde eine PCR mit Primern für 18S-RNA durchgeführt und diese mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 4.12.8.1) überprüft.

#### 4.10.5.3 Real-Time-PCR

Die Real-time-PCR dient zur Quantifizierung von Transkripten auf cDNA-Ebene. Bei dieser PCR-Methode wird, wie auch bei der Visualisierung von DNA im Agarosegel durch Ethidiumbromid, die Fluoreszenz von DNA-bindenden Farbstoffen gemessen. Da die DNA während einer PCR amplifiziert wird, nimmt die Fluoreszenz, die nach jedem Zyklus bestimmt wird, in Form einer sigmoidalen Wachstumskurve zu. Durch die hier verwendete Methode konnte die Menge der Transkripte relativ, nicht absolut, bestimmt werden. Als Standard dient die 18S-RNA, wobei vorausgesetzt wurde, dass sie in allen Zellkultur-Passagen und Geweben in einem konstanten Verhältnis vorlag. Eine weitere Voraussetzung war, dass die cDNA-Synthese der verschiedenen Transkripte aus unterschiedlichen Probematerialien gleichmäßig erfolgte.



Das Exitationsmaximum des verwendeten Farbstoffes liegt bei 497nm, das Emmisionsmaximum bei 520 nm.

*SyprGreen<sup>TM</sup>-Stammlösung:* 100 x in DMSO

*SyprGreen<sup>TM</sup>-Arbeitslösung:* 1 x in HPLC -H<sub>2</sub>O

Ansatz für eine Reaktion:

2,0	µL	10× PCR-Puffer (mit MgCl <sub>2</sub> , [1,5 mM])
2,0	µL	SybrGreen-Arbeitslösung
0,4	µL	10 mM dNTPs
0,8	µL	10 pmol·µL <sup>-1</sup> Primer A
0,8	µL	10 pmol·µL <sup>-1</sup> Primer B
0,1	µL	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U·µL <sup>-1</sup> )
2,0	µL	DNA-Matrize
13,9	µL	HPLC-H <sub>2</sub> O

Da bei dieser quantitativen Methode Pipettierfehler minimiert werden sollten, wurde folgender 20 x Pre-mix pro jeweiligem Primer-Paar angesetzt.

Pre-mix für 20 Reaktionen:

40	µL	10× PCR-Puffer (mit MgCl <sub>2</sub> , [1,5 mM])
40	µL	SybrGreen-Arbeitslösung
8	µL	10 mM dNTPs
16	µL	10 pmol·µL <sup>-1</sup> Primer A
16	µL	10 pmol·µL <sup>-1</sup> Primer B
2,0	µL	Hotstar- <i>Taq</i> -Polymerase (5 U·µL <sup>-1</sup> )
2,0	µL	cDNA-Matrize
238	µL	HPLC-H <sub>2</sub> O

Von diesem Pre-mix wurden jeweils 18 µL in die jeweilige Kavität des PCR-Reaktionsgefäßes vorgelegt und anschließend 2 µL Probe zugegeben.

Für die Standardgerade wurden von der fBMEC-cDNA fünf sequentielle 1:5 Verdünnungen einer 50 ng·µL<sup>-1</sup>-Stammlösung hergestellt. Die Konzentrationen bezogen sich hierbei auf die in der cDNA-Synthese eingesetzte RNA. Daraus resultiert eine Endkonzentration von 20 ng, 4ng, 0,8 ng, 0,16 ng und 32 pg in den Reaktionsgefäßen, wobei noch eine HPLC-H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle Anwendung fand. Diese wurde für jedes Primerpaar als Doppelbestimmung angesetzt.

Für die Bestimmung der unbekannten Probenmenge wurde von fBMEC eine 1:10, von P0 eine 1:5 und von P2 eine 1:5 Verdünnung in Doppelbestimmung mit dem jeweiligen Primerpaar verwendet.

*PCR-Programm:*

Schritt	Temp [°C]	Zeit [min]	Bezeichnung
1	95	15	Denaturierung
2	95	0,25	Denaturierung
3	54-60	0,5	Anealing
4	72	0,5	Extension
5	-	-	Detektion
6	-	-	Schmelzkurve

Die Schritte 2 bis 5 wurden 40 mal wiederholt (40 Zyklen). Das Programm ist nahezu identisch zu dem normalen PCR-Programm (s. 4.12.7.1), jedoch folgt der Extension die Detektion der Fluoreszenz, welche in jeder Kavität im Gerät gemessen wird. Zusätzlich wurde am Ende des Programms die Schmelzkurve der gebildeten PCR-Produkte über die Fluoreszenz ermittelt. Somit konnte die Homogenität der Produkte der unterschiedlichen Reaktionsansätze kontrolliert werden.

Zur Auswertung ist der Untergrund vor dem Anstieg der Fluoreszenz abgezogen und eine Gerade durch die Messwerte der Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration gelegt worden. Die Quantifizierung der unbekannten Proben erfolgte dann über die Geradengleichung der Verdünnungsreihe. Da dies keine absolute Methode darstellte, wurden die Mengen des jeweiligen Transkriptes der einzelnen Proben in ihrem Verhältnis zur 18S-RNA-Menge miteinander verglichen. Hierbei ist das Verhältnis Transkript zu 18S in fBMEC als 100 % definiert worden.

#### 4.10.5.4 PCR für die Phage Display-Bank

##### **Amplifikation I**

Zunächst erfolgte über die PCR die Amplifikation ausgehend von der genomischen DNA. Dazu kamen folgende Oligonukleotidpaare zur Amplifikation der jeweiligen Antikörpergene aus der DNA zur Anwendung: I und II; II16 und IV16, IV16 und IV22 (s. Abb. 5.51). Jeweils die ersten Primer besitzen eine *EcoRI*-Schnittstelle und die jeweils zweiten Primer eine *BamHI*-Schnittstelle. Nachfolgend sind der Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen aufgeführt.

Ansatz:

5,0	μL	10× PCR-Puffer (mit MgCl <sub>2</sub> , [1,5 mM])
1,0	μL	10 mM dNTPs
2,0	μL	10 pmol/μL Primer A
2,0	μL	10 pmol/μL Primer B
0,5	μL	5 U/μL Hifi- <i>Taq</i> -Polymerase (5 U·μL <sup>-1</sup> )
x	μL	DNA-Matrize
ad 50	μL	HPLC-H <sub>2</sub> O

PCR-Programm:

Schritt	Temp [°C]	Zeit [min]	Bezeichnung
1	95	0,5	Denaturierung
2	95	0,25	Denaturierung
3	68 (-0.5°C/Schritt)	0,25	Anealing
4	68	1	Extension
5	95	0,25	Denaturierung
6	52	0,25	Anealing
7	68	1	Extension
8	8	∞	Abstoppen

Die Schritte 2-4 wurden 25 mal wiederholt, bevor die Schritte 5-8 30 mal wiederholt wurden.

### Amplifikationen II und III

Ausgehend von den Klonen für die schwere Kette und die leichten Ketten (DP47, DPL22 und DPK22) wurde im ersten Schritt das Insert der jeweiligen Plasmide mit den Oligonukleotidpaaren a/b, e16/f16 bzw. e22/f22 amplifiziert. Dadurch wurde mit dem jeweils letzten Oligonukleotid der Paare über einen durch chemische Synthese randomisierten Abschnitt eine zufällige Sequenz in die Antikörpergene eingefügt (s. Abb. 5.51).

Als Matrize fanden die Klone der schweren und der beiden leichten Ketten Anwendung. Die Anealing-Temperatur bei Schritt 6 betrug 58°C. Ansonsten wurden der Ansatz und die Führung der Reaktion analog zur Amplifikation I durchgeführt.

Die spezifischen PCR-Produkte wurden eluiert (4.10.3.3) und in die Amplifikation III als Matrizen eingesetzt. Die PCR für die schwere Kette erfolgte mit den Oligonukleotiden c und d. Bei den leichten Ketten waren dies die Paare h16/g16 bzw. h22/g22. Über diese Primer sind weitere Schnittstellen für Restriktionsenzyme in die Sequenz eingebracht

worden. Die Bedingungen und die Reinigung waren davon abgesehen wie bei Amplifikation II.

### Fusion

Über die Oligonukleotide d und h16/h22 ist eine sog. *Linker*-Region an die Antikörpergene angehängt worden. Über eine PCR wurde jeweils eine leichte Kette (DPL16 oder DPK22) mit der schweren Kette (DP47) fusioniert. Mit Hilfe der Oligonukleotide c und g16 bzw. g22 und den Produkten der Amplifikation III wurde so ein DNA-Abschnitt erhalten, der Schnittstellen für diverse Restriktionsenzyme enthält und aus einer Verbindung zwischen der schweren Kette DP47 und einer leichten Kette (DPL16 oder DPK 22) bestand.

Der Reaktionsansatz erfolgte analog zur Amplifikation I, wobei die Primer zunächst nicht hinzugegeben wurden.

Schritt	Temp [°C]	Zeit [min]	Bezeichnung
1	95	0,5	Denaturierung
2	95	0,25	Denaturierung
3	42	0,25	Fusion
4	68	1	Extension
5	95	0,25	Denaturierung
6	52	0,25	Anealing
7	68	1	Extension
8	8	$\infty$	Abstoppen

Die Schritte 2-4 wurden 10 mal wiederholt, worauf die Zugabe der Primer direkt nach Abschluss dieser Zyklen erfolgte. Im Anschluss daran wurden die Schritte 5-7 30 mal wiederholt.

#### 4.10.6 Reinigung von PCR-Produkten

Diese Reinigungsmethode konnte nur angewendet werden, wenn lediglich ein PCR-Produkt erhalten wurde. Bei dieser Methode sind Protokoll und Puffer des Herstellers verwendet worden.

### *QIAquick® PCR Purification Kit*

Zunächst wurde die PCR-Probe (s. 4.12.7.1 und 4.12.7.3) mit dem fünffachen Volumen an PB-Puffer versetzt und auf eine QIAprep-Säule aufgetragen, die auf einem 2 ml Sammelgefäß saß. Anschließend ist dieses für 1 min bei 16.000 x g zentrifugiert worden. Der Durchfluss war zu verwerfen, die Säule mit 750 µl PE-Puffer zu waschen und für 30 sec bei 16.000 x g zu zentrifugieren. Der Durchfluss wurde abermals verworfen und die Säule zum Trocken bei 16.000 x g 1 min zentrifugiert. Danach ist die Säule auf ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß übertragen und 20 µL EB-Puffer auf die Membran gegeben worden. Nach 1 min Inkubation bei RT wurde die DNA durch Zentrifugation für 1 min bei 16.000 x g eluiert. Die DNA-Lösung wurde bei –20°C gelagert.

## 4.10.7 Sequenzierung von DNA

### *4.10.7.1 PCR der Sequenzierung*

Bei der Sequenzierung von DNA findet das sog. Kettenabbruch-Verfahren nach Sanger Anwendung (Sanger et al. 1977). Hierbei werden bei einer PCR-Reaktion zusätzlich auch Didesoxynukleotide eingesetzt. Hierdurch kommt es zu statistischen Abbrüchen der Reaktion. Durch Markierung der vier Didesoxynukleotide mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen können die Fragmente detektiert werden. Bei der Markierung handelt es sich um Energietransfer-Farbstoffe, bei denen ein Fluoreszeinderivat den Donor darstellt und als Akzeptor jeweils eines von vier unterschiedlichen Dichlororhodaminen fungiert. Zur Analyse werden die fluoreszenzmarkierten DNA-Einzelstränge kapillarelektrophoretisch getrennt, im Anschluss mittels eines Argon-Lasers angeregt und schließlich detektiert. Aufgrund der Trennung nach der Größe der markierten Fragmente kann so die Sequenz bis ca. 500 Nukleotide hinter dem Primer bestimmt werden.

### *5x Sequenzier-Puffer*

*Sequenzier-Mix:* ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits

Für die Sequenz-PCR sind etwa 200-500 ng Plasmid-DNA (s. 4.12.3.1) in variabler Konzentration eingesetzt worden. Zu diesem Volumen wurden 4 µl des Sequenzier-

Mixes und 0,5 µl der Arbeitslösung eines entsprechenden Primers gegeben. Das Endvolumen der Sequenzierung wurde mit HPLC-H<sub>2</sub>O auf 20 µl eingestellt.

PCR-Programm der Sequenzierung:

Schritt	Temp [°C]	Zeit	Bezeichnung
1	95	10 sec	Denaturierung
2	56	5 sec	Anealing
3	60	2 min	Schreiben

Die Schritte 1-3 wurden 25 mal wiederholt.

#### 4.10.7.2 Reinigung der Seq-PCR mit paramagnetischen Partikeln

Die Reinigung der Sequenzier-Reaktion ist zum einen zur Entfernung der Salze und Proteine notwendig. Vor allem aber dient sie der Entfernung der markierten und nicht umgesetzten Didesoxynukleotide, die zur Störung der Detektion führen können.

Die Reinigung kann entweder mit Gelfiltrationssäulchen, der Fällung der DNA mit Alkoholen oder mittels magnetischer Partikel erfolgen.

*Wizard® MagneSil™ Sequencing Reaction Clean-Up System*

*90 % (v/v) Ethanol*

*Hi-DI™ formamid*

Für die Reinigung wurden paramagnetische Partikel verwendet, welche die PCR-Produkte binden. Hierbei wurden jeweils 180 µl der Partikel-Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und mit dem Produkt einer PCR-Sequenzierungs-Reaktion (s. 4.12.6.1) gemischt. Nach 5 min Inkubation unter gelegentlichem Mischen wurden die Reaktionsgefäße in eine Halterung mit integriertem Magneten gestellt, die Flüssigkeit abgezogen und verworfen. Anschließend wurden die magnetischen Partikel mit den daran haftenden Sequenzierungsprodukten mit 90% EtOH resuspendiert und für 5 min bei RT unter gelegentlichem Mischen inkubiert. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt und die Partikel bei RT getrocknet. Die Sequenzierungsprodukte wurden schließlich mit 20 µL HighDye™ eluiert. Nach Abtrennung der Partikel durch den Magneten wurde das Eluat abgenommen, in ein 0,5 ml Sequenzierungsgefäß überführt und mit einer Septe verschlossen.

## 4.10.8 Agarose-Gelelektrophorese

### 4.10.8.1 Trennung von DNA in der Agarose-Gelelektrophorese

Als Standard-Methode für die Analyse von DNA-Fragmenten wird die Agarose-Gelelektrophorese angewendet. Durch Anlegen einer Spannung wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle in Abhängigkeit ihrer Größe verschieden schnell in der Agarose-Matrix.

<i>50× TAE-Puffer:</i>	2	M	Tris
	1	M	HOAc
	100	mM	EDTA

*Ethidiumbromid-Arbeitslösung:* 1 mg·mL<sup>-1</sup> in HPLC-H<sub>2</sub>O

<i>DNA-Auftragspuffer:</i>	50	% (v/v)	Glycerin
	0,2	% (w/v)	SDS
	0,05	% (w/v)	Bromphenolblau
	0,05	% (w/v)	Xylencyanol

Es wurden routinemäßig 0,8; 1,0; 1,5 und 2,0%ige (w/v) Agarosegele in 1x TAE-Puffer eingesetzt. Wobei die ersten drei Gellösungen nach dem Sieden und der damit verbundenen Auflösung der Agarose bis zur weiteren Verwendung bei 75°C gelagert werden konnten.

Zur Herstellung des Gels ist die flüssige Agaroselösung nach Einstellen einer Ethidiumbromid-Konzentration von 0,5 µg·mL<sup>-1</sup> in eine horizontale Form mit einem Kamm zur Bildung der Auftragstaschen gegossen worden.

Nach Erstarren des Gels wurde dieses mit 1 x TAE-Puffer überschichtet, die Proben mit 6 x Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen gegeben. Die Spannung betrug bei einem Lauf je nach Gelgröße 100-120 V. Der Gellauf wurde beendet, sobald die Bromphenolblaufront etwa 2/3 der Gesamtlaufstrecke erreicht hatte.

Unter UV-Licht wurde die DNA durch interkaliertes Ethidiumbromid sichtbar und die Ergebnisse mittels Digitalfotografie dokumentiert.

### 4.10.8.2 Trennung von RNA in der Agarose-Gelelektrophorese

<i>10× MOPS-Puffer:</i>	200	mM	MOPS
<i>pH 7,0</i>	50	mM	NaOAc
	10	mM	EDTA

RNA-Mini-Gele:	1	% (w/v)	Agarose (p.a.)
	18	% (v/v)	Formaldehyd in DEPC-aqua bidest
<i>Proben-Puffer:</i>	50	% (v/v)	Formamid
	16	% (v/v)	Formaldehyd
	10	% (v/v)	10 x MOPS-Puffer in DEPC-aqua bidest.
<i>RNA-Auftragspuffer:</i>	50	% (v/v)	Glycerin
	1	mM	EDTA
	0,25	% (w/v)	Bromphenolblau

*Ethidiumbromid-Lösung:* 1 mg·mL<sup>-1</sup> in HPLC-H<sub>2</sub>O

Zum Giessen des Gels ist die Agarose unter Erhitzen in *aqua bidest.* gelöst worden. Anschließend wurde sie auf etwa 60°C abgekühlt und der 10× MOPS-Puffer sowie das Formaldehyd (p.a.) zugegeben. Es wurde ein Gel-Kamm mit 12 Taschen verwendet. Zur Probenvorbereitung wurden 5 µg RNA in 10 µL Volumen mit 20 µL Proben-Puffer für 15 min bei 65 °C inkubiert. Auf Eis wurden 3 µL Ethidiumbromid-Lösung und 5 µL RNA-Auftragspuffer hinzugefügt. Nach Auftragen der Proben ist eine Spannung von 90 V an das Gel angelegt worden. Nach Beendigung des Laufes wurden unter UV-Licht die Ergebnisse mittels Digitalfotografie dokumentiert.

#### 4.11 Phage Display

*Phage Display* wurde als eine molekulare Technologie entwickelt [Smith, 1985], welche die Präsentation von großen Peptid- oder Protein-Bibliotheken auf der Oberfläche von filamentösen Phagen erlaubt. Diese Bibliotheken, oder auch Banken, erlauben die Selektion von präsentierten Peptiden und Proteinen, wie beispielsweise von Antikörpern mit hoher Affinität und Spezifität. Eine Besonderheit dieser Methode liegt darin, dass der experimentelle Phänotyp direkt mit dem Genotyp über den Phagen verknüpft ist, was eine unbegrenzte Vermehrung eines selektierten Antikörpers erlaubt. Antikörper sind hochkomplexe Proteine, die in Vertebraten ein Verteidigungssystem bilden, um körperfremde Stoffe zu identifizieren. Durch variable Spleißmechanismen von Gen-Kassetten und zusätzliche Mutationsmechanismen entsteht eine immense Antikörpervielfalt die insbesondere durch die hypervariablen Schleifen die sog. CDRs (*Complement Determining Region*) erreicht wird. Diese „Bank“ ist in den B-Zellen des Lymphgewebes lokalisiert. Die Vielfalt wird durch mehr als 50 schweren Ketten (V<sub>H</sub>)



und mehr als 70 leichten Ketten ( $V_{\kappa}$  und  $V_{\lambda}$ ) ermöglicht, wobei ein Antikörper aus je zwei dieser Ketten geformt wird. Den größten Einfluss auf die Varianz hat die CDR3. Von den Ketten dominieren die schwere Kette DP47 und die leichten Ketten DPL16 und DPK22 im funktionellen Repertoire [Pini et al., 1998].

Durch die Fortschritte in der Molekularbiologie ist es möglich geworden, die natürliche Vielfalt der Antikörper nachzuahmen. Es gibt eine Reihe von rekombinanten Antikörperfragmenten wie *Fab*, *Fv* und *scFv* (*single-chain Fv*), die rekombinant erzeugt werden.

Die einzelnen PCR-Schritte zum Aufbau der Bank sind unter 4.10.5.4 angegeben. Ebenso sind die Restriktion, Ligation und Transformation analog zu den beschriebenen Methoden durchgeführt worden.

#### 4.11.1 Produktion der Phagen

Für die Produktion der Phagenpartikel wurden *E. coli*-Bakterien benötigt, welche mit dem Fuse-Vektor transformiert wurden. Dies wurde entweder durch Elektroporation oder durch Infektion mit dem Phagen selbst erreicht. Das Plasmid besitzt eine Tetracyclin-Resistenz und trägt das Gen für die *scFv*-Antikörper.

Mit einer Über-Nacht-Kultur TG1-Bakterien wurden in 5 mL 2xYT angeimpft und bei 37°C bis zu einer  $OD_{600}=0,8$  unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Phagenpartikel einer Selektionsrunde und ohne Schütteln wurden die Bakterien bei 37°C für 30 min infiziert. Die Suspension wurde in 100 mL 2xYT-TET überführt, eine Probe zur Bestimmung des Phagentiters genommen und die Suspension 12-16 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

Bei der Phagentiterbestimmung wird die Anzahl der infektiösen Phagen ermittelt. Der Phagentiter wurde durch Ausplattieren der genommenen Probe bzw. deren Verdünnungen auf YT-TET-Platten durch die Bildung von Kolonien bestimmt.

Bei Verwendung der Fuse-Phagen-Bank erfolgte das Animpfen von 200 mL 2xYT-TET-Medium mit 50  $\mu$ L des DH5 $\alpha$ -Bakterienstammes, der mit dem Fuse-*scFv*-Vektor transformiert wurde. Die resultierende Suspension wurde 12-16 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. In beiden Fällen folgte die Isolierung der Phagenpartikel.

#### 4.12.2 Isolierung der Phagenpartikel

<i>PEG/NaCl :</i>	20 2,5	%(w/v) M	Polyethylenglykol PEG 6000 NaCl
<i>SM-Puffer, pH 7,5:</i>	35 100  10 0,01	mM mM  mM %(w/v)	Tris-Cl NaCl Autoklavieren MgCl <sub>2</sub> Gelatine

Die Phagenpartikel wurden aus dem Überstand einer Tags zuvor infizierten Bakteriensuspension isoliert.

Die Zellsuspension aus der Über-Nacht-Kultur wurde im GSA-Rotor bei 4°C und 10.800 x g für 10 min zentrifugiert. Der von den Zellen befreite Überstand musste mit einem Fünftel Volumenanteil PEG/NaCl auf Eis für mind. 30 min inkubieren. Anschließend wurden die ausgefallenen Phagen durch Zentrifugation im GSA-Rotor bei 4°C und 10.800 x g für 30 min sedimentiert. Das Phagen-Sediment wurde mit 2 ml SM-Puffer resuspendiert und von zellulären Trümmern durch Zentrifugation 11.200 x g für 2 min in der Tischzentrifuge befreit. Vom resultierenden Überstand wurde nach der Zugabe von 15% (v/v) Glycerin der Phagentiter bestimmt und die Phagen bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

#### 4.12.3 Selektion der Phagen gegen *Lipid rafts*

Die Selektion dient dazu, aus der kombinatorischen *Phage Display*-Bank spezifisch die Antikörper zu isolieren, die ein Antigen erkennen. In diesem Fall wurden zwei Selektionsrunden durchgeführt, wobei diese nicht identisch durchgeführt wurden.

<i>MES-Puffer :</i>	25	mM	MES
<i>pH 6,5</i>	150	mM	NaCl
<i>Tris-Puffer, pH 7,5 :</i>	1	M	Tris-Cl
<i>Triethylamin-Puffer :</i>	100	mM	Triethylamin
<i>Trypsin-Lösung :</i>	1	µg·mL <sup>-1</sup>	Trypsin
<i>Blocklösung:</i>	5	%(w/v)	Magermilchpulver in MES-Puffer

In der ersten Runde wurden die 1,5 mL-Reaktionsgefäße mit 1,5 mL Blocklösung 30 min abgesättigt. Nach dem Auswaschen der Reaktionsgefäße mit MES-Puffer wurden 35 µg der *Lipid Raft*-Fraktion P0 mit  $7,8 \cdot 10^9$  Phagen in 500 µL für 30 min unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Parallel wurde in der Kontrolle Phagen ohne *Lipid Raft*-Fraktion in einem Reaktionsgefäß inkubiert. Beide Proben wurden nachfolgend gleich behandelt.

Anschließend wurde die *Lipid Raft*-Fraktion mit den gebunden Phagen bei  $8.500 \times g$  für 5 min sedimentiert und darauf das Sediment mit 500 µL MES-Puffer resuspendiert. Dieser Vorgang wurde noch 5 mal wiederholt. Die Elution der Phagen erfolgte zunächst durch 10minütige Inkubation mit 200 µL Triethylamin. Der resultierende Überstand wurde sofort mit 400 µL Tris-Puffer neutralisiert. Die *Lipid Raft*-Fraktion wurde im Anschluß an die Elution mit Triethylamin nochmals für 10 min mit Trypsin-Lösung inkubiert. Mit den Eluaten wurden je 5 mL Bakteriensuspension infiziert und der Phagentiter daraus bestimmt. Nach der Infektion wurden die Suspensionen vereinigt und insgesamt 400 mL YT-Tet Medium infiziert.

Da in der ersten Selektionsrunde in der Kontrolle im Vergleich zur Probe ein zu hoher Phagentiter ermittelt wurde, musste die Selektion optimiert werden.

Bei der zweiten Selektion wurden die resultierenden Phagen der ersten Selektion eingesetzt. Wieder wurde im Vergleich eine Kontrolle ohne *Lipid Raft*-Fraktion analog behandelt. Es wurden 35 µg *Lipid Raft*-Fraktion mit  $2 \cdot 10^{10}$  Phagen in Blocking-Solution für 30 min unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Im Anschluss erfolgten die Wasch- und Elutionsschritte wie bei der ersten Selektion, wobei die Zentrifugation bei  $20.000 \times g$  durchgeführt wurde. Mit den Eluaten wurden je 5 mL Bakteriensuspension infiziert und der Phagentiter daraus bestimmt. Anschließend wurden je 200 mL YT-Tet-Medium infiziert.

#### 4.12.4 ELISA mit Phagen

Nachdem Phagen gegen die *Lipid rafts* selektioniert waren, mussten Klone gefunden werden, die an einen Bestandteil der Fraktion binden. Die Identifizierung erfolgte mittels eines ELISAs.

##### YT-TET

*Blocklösung:* 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS<sup>2-</sup>

*Antikörperlösung:* Anti-M13 Anti-(M13)-IgG (Maus) mit Meerrettich-  
peroxidase konjugiert (1:2500) in PBS<sup>2-</sup> verdünnt

*PBS<sup>2-</sup>*

*ABTS-Lösung :*           0,4       mM       ABTS  
                              50       mM       Zitronensäure, pH 4,0

*ABTS-Arbeitslösung:* 2 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 % (v/v) pro mL ABTS-Lösung

Zunächst wurden 95 Klone einer Plattenkultur der zweiten Selektionsrunde (4.12.3) in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte (gewölbter Boden) mit 150 µL YT-TET mit sterilen Pipettenspitzen überführt. Nach Abdichten der Platte mit Parafilm wurde diese 16-20 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden bei 1.800 x g für 10 min sedimentiert und der phagenhaltige Überstand für den ELISA verwendet.

Hierzu musste eine 96-Loch-Platte mit Antigen beschichtet werden. Da die *Lipid-Raft*-Fraktion selbst aufgrund der limitierten Menge nicht zum Beschichten in Frage kam, wurden ganze Zellen für den ELISA herangezogen. Hierzu wurden Zellen der Passage 0 in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte bis zur Konfluenz, wie unter 4.2.5 beschrieben, inkubiert. Die Zellen wurden fixiert (4.2.6) und anschließend 3 mal mit PBS<sup>2-</sup> gewaschen. Anschließend folgte eine abgewandelte Immunfärbung (4.7.3).

Blocken:	30 min	Blocklösung
Erstantikörper:	30 min	Kulturüberstand
Waschen:	6 x 10 sec	PBS <sup>2-</sup>
Zweitantikörper:	30 min	Antikörperlösung
Waschen:	6x 10sec	PBS <sup>2-</sup>
<i>Entwicklung:</i>	<i>5-30 min</i>	<i>ABTS-Arbeitslösung</i>

Nach Auftreten einer deutlichen Färbung wurde die Absorption bei 405 nm der Kavitäten der Platte im ELISA-Reader bestimmt. Um die Ergebnisse zu verifizieren, wurde der Test mit den gleichen Klonen nach neuer Präparation der Phagen nochmals wiederholt. Es wurden dann lediglich die Klone berücksichtigt, die in beiden Versuchen ein deutliches Signal zeigten. Von den positiven Klonen wurde anschließend die Sequenz ermittelt.

#### 4.12.5 Western Blot und Immunhistochemie mit Phagen

Der Überstand von Über-Nacht Kulturen der positiven Klone aus 4.12.4 wurde dazu verwendet, um einen Western Blot mit den Phagen gegen die geblottete *Lipid-Raft* Fraktion von Cortex und kultivierten Hirnkapillarendothelzellen der Passagen 0 und 2 durchzuführen.

*Zweitantikörperlösung I:* Anti-M13 Anti-(M13)-IgG (Maus) mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert (1:2500) in PBS<sup>2-</sup> verdünnt  
*Zweitantikörperlösung II:* Anti-M13 Anti-(M13)-IgG (Maus) (1:2500) in PBS<sup>2-</sup> verdünnt

*Drittantikörperlösung:* Anti-(IgG-Maus, whole molecule)-IgG (Ziege), mit Alkalische Phosphatase konjugiert, in TBST-Puffer 1:5.000 verdünnt

<i>Färbelsg. Peroxidase:</i>	50	mM	Tris-HCl
<i>(10 mL), pH 7,5</i>	6	mg	3,3'-Diaminobenzidin·4HCl
	0,03	% (w/v)	CoCl <sub>2</sub>
	10	µL	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 % (v/v))

<i>Formalin-Lsg.:</i>	4	% (w/v)	Paraformaldehyd in PBS <sup>2-</sup>
<i>pH 7,0</i>			

*weitere Materialien s. 4.7.3*

Die Färbung wurde analog zur unter 4.7.3 beschriebenen Immunfärbung durchgeführt. Es erfolgte allerdings ein zusätzlicher Schritt mit der Verwendung des Kulturüberstands als Erstantikörperlösung. Hierzu wurden die Bakterien der Über-Nacht-Kultur durch Sedimentation bei 3000 x g für 10 min vom Überstand getrennt.

Waschen:	3 x 5 min	TBST-Puffer
Blocken:	30 min	Rotiblock (1x)
Waschen:	1 x 5 min	TBST-Puffer
Erstantikörper:	2 h	Kulturüberstand
Waschen:	3 x 5 min	TBST-Puffer
Zweitantikörper I:	2 h	Zweitantikörperlösung
Waschen:	3 x 5 min	TBST-Puffer
Substratreaktion:	bis zur gew. Farbtintensität	Färbelsg. Peroxidase
Abstoppen:	> 10 min	<i>aqua. bidest.</i>

Die Dokumentation der gefärbten Membranen erfolgte über einen Scanner.

Bei der Immunhistochemie mit den Phagen wurde ein alternatives Protokoll zur beschriebenen Methode (4.9) angewendet.

Der zusätzliche Schritt mit dem Kulturüberstand als Erstantikörper wurde auch bei der Färbung von fixierten Zellen und Schnitten eingeschoben. Zusätzlich wurden ein Fixierungsschritt mit Formalin-Lösung (4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS<sup>2-</sup>-Puffer, pH 7,0) nach der Bindung der Phagen auf den Zellen benötigt.

Waschen:	3 x 5 min	PBS <sup>2-</sup> -Puffer
Blocken:	30 min	Rotiblock (1x)
Waschen:	1 x 5 min	PBS <sup>2-</sup> -Puffer
Erstantikörper:	30 min	Kulturüberstand
Waschen:	3 x 5 min	PBS <sup>2-</sup> -Puffer
Fixierung	10 min	Formalin-Lsg.
Waschen:	3 x 5 min	PBS <sup>2-</sup> -Puffer
Zweitantikörper II:	30 min	Zweitantikörperlösung
Waschen:	1 x 10 sec	PBS <sup>2-</sup> -Puffer
Waschen:	1 x 5 min	PBS <sup>2-</sup> -Puffer
Waschen:	1 x 5 min	<i>aqua bidest.</i>

Anschließend wurden die Deckgläschen bei 37°C getrocknet und mit 2 µL Kaiser's Glyceringelatine auf einem Objektträger fixiert. Die mit Zellen bewachsene Seite des Deckgläschens war hierbei auf den Objektträger aufzubringen.

Nach dem Verfestigen der Gelatine bei RT konnten die gefärbten Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop oder dem konfokalen Lasermikroskop untersucht werden.

## 5 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sind *Lipid rafts* aus verschiedenen Geweben und Zellkulturen isoliert und analysiert worden. Zur Bereitstellung des benötigten Zellkulturmaterials erfolgte zunächst die Präparation von Hirnkapillarendothelzellen aus dem Gehirn von Schweinen. Die isolierten Zellen wurden anschließend in Kultur genommen, um Zellen von Passage 0 und Passage 2 zu erhalten.

Zur Etablierung der Isolation von *Lipid rafts* als in Detergens nichtlösliche Fraktion, wurden diese aus *Cortex*-Gewebe präpariert. Analog erfolgte die Isolation aus kultivierten C6-Zellen und BMEC der Passagen 0 und 2. Die *Lipid raft*-Fraktionen der Zellen wurden durch SDS-PAGE gelelektrophoretisch getrennt und massenspektrometrisch analysiert. Die Ergebnisse wurden anschließend miteinander verglichen

Weiterhin wurde eine *Phage Display*-Bank aufgebaut und deren Funktionalität mit der erfolgreichen Selektion gegen die *Lipid raft*-Fraktion der BMEC von Passage 0 bewiesen.

Anschließend sind einige der identifizierten Proteine der *Lipid raft*-Fraktionen mittels Immunhistochemie, Western Blot und *Real time*-PCR weiter charakterisiert worden.

### 5.1 Isolierung der Hirnkapillarendothelzellen

Die BMECs wurden durch ein kombiniertes mechanisches und enzymatisches Verfahren aus Cortexgewebe von Schweinen gewonnen (4.1). Eine Präparation in der Sterilwerkbank war dazu nicht notwendig, da während der nachfolgenden Kultivierung im Allgemeinen keine Kontaminationen durch Pilze oder Bakterien auftraten.

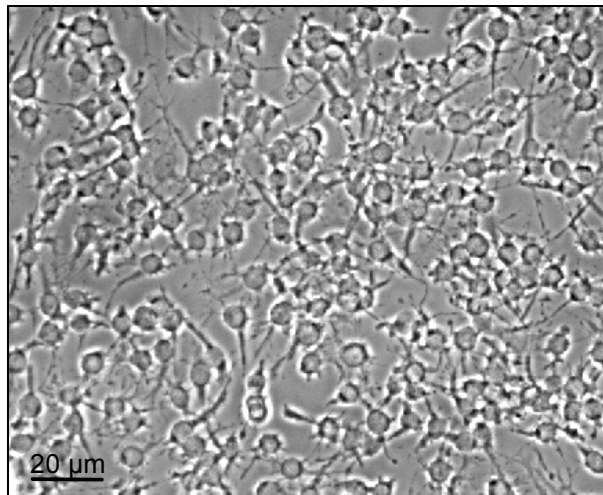
Eine Schwierigkeit bei der Präparation trat, resultierend aus der zunehmenden Viskosität der Lösung, während des zweiten enzymatischen Schrittes auf. Die Viskosität rührt von der Freisetzung von Nukleinsäuren aus zerstörten Zellen her. Dies bedeutete einen längeren enzymatischen Verdau mit Kollagenase und folglich eine geringere Vitalität der Zellen am Ende der Präparation. Das Problem konnte durch die Zugabe von Benzoase gelöst werden, welche ein größeres Substratspektrum als normale DNase akzeptiert. Dadurch konnte die Viskosität gesenkt, die Behandlung mit Kollagenase verkürzt und somit die Vitalität der isolierten Zellen erhöht werden.

Nach dem Percollgradienten fiel die starke Rotfärbung der wolkenartigen Bande auf, was auf einen hohen Restanteil von Erythrocyten schließen ließ. Daher wurden letztere lysiert und so von den präparierten Zellen getrennt.

Die letztendlich erhaltenen Zellen wurden durch Antikörper und enzymatische Tests als Hirnkapillarendothelzellen charakterisiert und waren nach der Präparation zu mehr als 90% vital (mdl. Mitteilung: B. Pelzer). Somit konnte von einer einheitlichen und geeigneten Population für die Zellkultur und die darauffolgenden Versuche ausgegangen werden.

## 5.2 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie unter 4.2 beschrieben, wobei sie für C6-Zellen (4.2.4) im Gegensatz zu den Hirnkapillarendothelzellen, einfach in großen Mengen durchzuführen war, da es sich bei ersteren um Tumorzellen handelte. Die C6-Zellen wurden zunächst zur Präparation der *Lipid rafts* (4.3) herangezogen. Von der Morphologie her handelte es sich um sternförmige Zellen, welche im konfluenten Stadium kompakter werden (s. Abb. 5.1). Die käuflich erworbenen Zellen wurden mit Hilfe von Anti-GFAP-Antikörpern als Astrozyten charakterisiert (B. Pelzer).



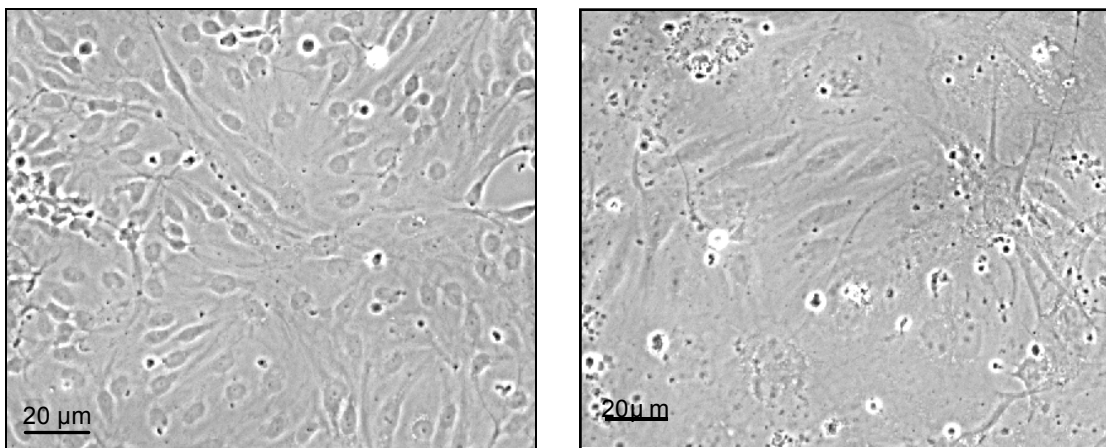
**Abb. 5.1:** Konfluente C6-Zellen im Durchlicht; der Balken entspricht 20 µm.

Die Kultivierung der Hirnkapillarendothelzellen (4.2.5) ist erheblich schwieriger, da die Primärkultur größere Schwankungen in der Qualität aufwies und im Vergleich zu den C6-Zellen anspruchsvollere Wachstumsbedingungen bedurfte. Da es sich hier um eine Primärkultur handelt, sind Kontaminationen mit anderen Zelltypen, wie Perizyten, und



Astrozyten nur schwer zu vermeiden. Die Verunreinigung mit Fremdzellen, vor allem mit Perizyten, ist durch die Schaffung optimaler Kulturbedingungen für die Hirnkapillarendothelzellen (Zelldichten der Passagen, Medium, Serum und Beschichtung der Kulturgefäße) ebenfalls minimiert worden, was durch immunhistochemische Untersuchungen mit Antikörpern gegen van-Willebrand-Faktor (BMEC) und  $\alpha$ -Actin glatter Muskelzellen (Perizyten) überprüft wurde (mdl. Mitteilung: B. Pelzer).

Wie in Abb. 5.2 zu sehen ist, unterscheiden sich P0 und P2 von der Morphologie her dahingehend, dass die Zellen der Passage 2 im Durchlicht von der Fläche her größer erscheinen. Außerdem sind bei Passage 0 zum Teil noch etwas dichtere, nicht ausgewachsene Zellverbände zu beobachten (Abb 5.2, links, linker Bildrand). Diese Verbände ragen zudem noch aus dem Zellrasen heraus. Beide Passagen zeigen ein spindelförmiges Muster.

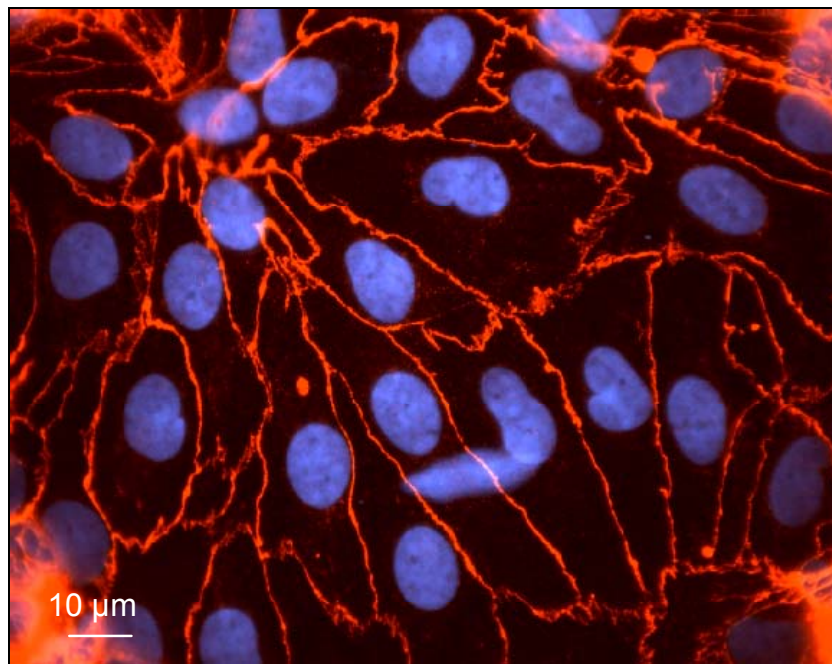


**Abb. 5.2:** Konfluente Hirnkapillarendothelzellen der Passagen 0 (links) und 2 (rechts).

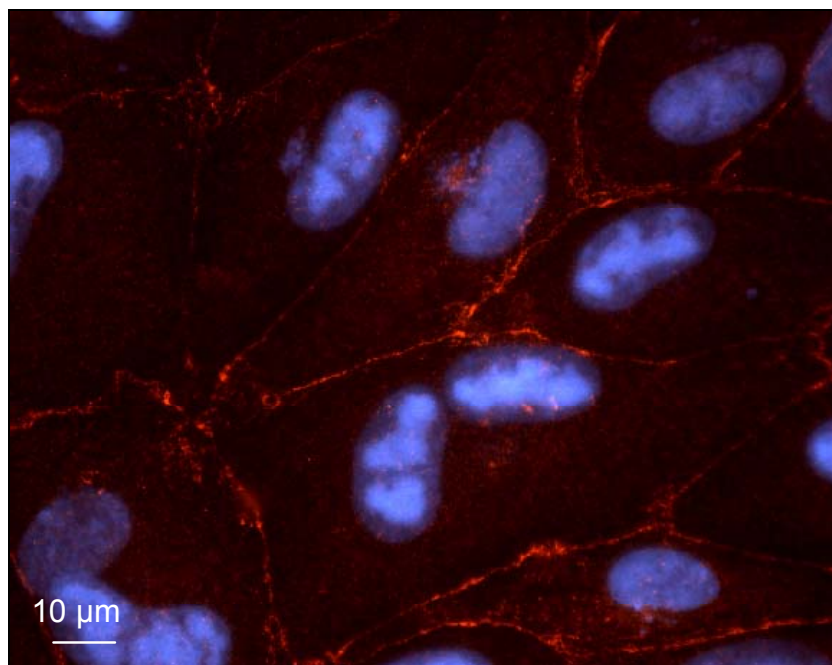
## 5.2.1 Charakterisierung von P0 und P2

### 5.2.1.1 Immunfärbung mit ZO-1

Hirnkapillarendothelzellen dedifferenzieren, wenn sie bereits wenige Passagen hinweg in Kultur gehalten werden (s. Einleitung und Aufgabenstellung). Auch das Lösen der festen Zell-Zell-Kontakte, was in Permeabilitätsmessungen bestimmbar ist, und das Fallen des transendothelialen Widerstandes wird beobachtet. Mit Hilfe der Immunhistochemie wurde die veränderte Expression des *tight junctions*-assoziierten ZO-1-Proteins (4.11) gezeigt (Abb. 5.3 und 5.4).



**Abb. 5.3:** Hirnkapillarendothelzellen der Passage 0 mit Antikörpern gegen ZO-1 (rot) gefärbt. Die Zellkerne sind durch DAPI blau markiert.



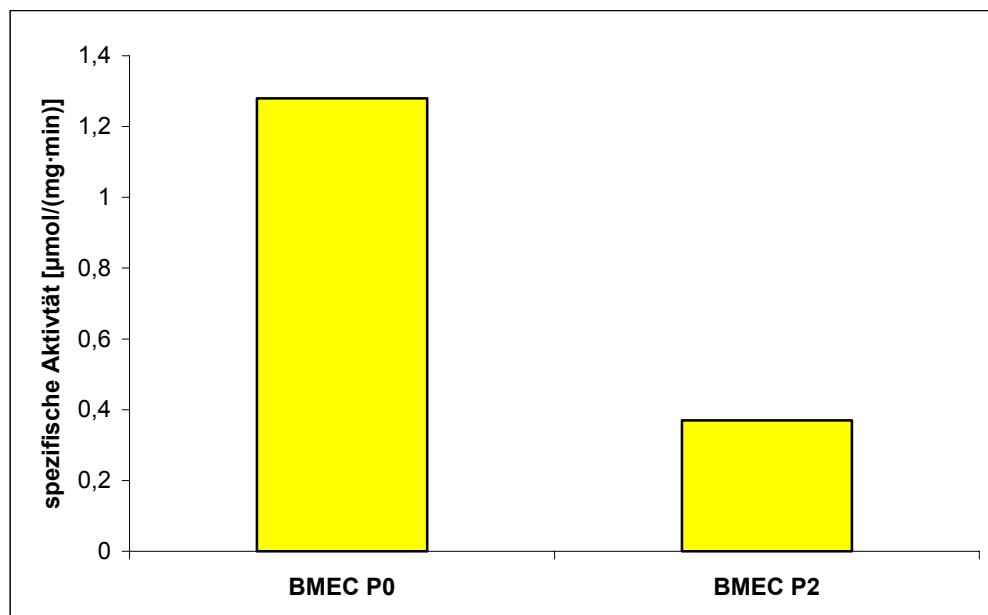
**Abb. 5.4:** Immunfärbung von Hirnkapillarendothelzellen der Passage 2 mit Antikörpern gegen ZO-1 (rot). Durch DAPI sind die Zellkerne blau gefärbt.

Bei der Passage 0 (Abb. 5.3) sind die rotgefärbten Zellränder, welche sich kontinuierlich um die Zellen ziehen, deutlich zu erkennen. Die Zellen bilden einen dichten Zellrasen, bei dem sie „puzzle-artig“ zusammenstoßen und fest miteinander verbunden sind. Bei gleicher Belichtungszeit und Vergrößerung ist die Färbung der Zellen der Passage 2 weniger intensiv, als die der Passage 0 (vgl. Abb. 5.4 mit Abb. 5.3). Die Zellränder sind nur noch an wenigen Abschnitten spezifisch gefärbt. Sowohl Zellkörper, als auch Zellkerne (blau) sind in Passage 2 größer als in Passage 0.

### 5.2.1.2 Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Zusätzlich zur Immunfärbung wurden die enzymatische Aktivität an Alkalischer Phosphatase der Zellen der beiden Passagen getestet. Nach der Isolierung von Zellen der Passage 0 und Passage 2 wurden die Zellen mit Detergens aufgeschlossen. Mit dem Homogononat wurde sowohl die Proteinmenge über BCA (4.6), als auch die spezifische Aktivität der Zellen der jeweiligen Passage bestimmt (4.7). Es zeigte sich, dass die spezifische Aktivität der Zellen der Passage 0 um den Faktor 3,5 größer war, als die von Passage 2 (Abb. 5.5).

Bezogen auf die Gesamtproteinmenge bedeutet dies, dass die Zellen der Passage 0 einen deutlich höheren Anteil des aktiven Enzyms aufweist, als die der Passage 2.



**Abb. 5.5:** Spezifische Aktivität der Alkalischen Phosphatase von Hirnkapillar-endothelzellen aus Passage 0 und Passage 2.

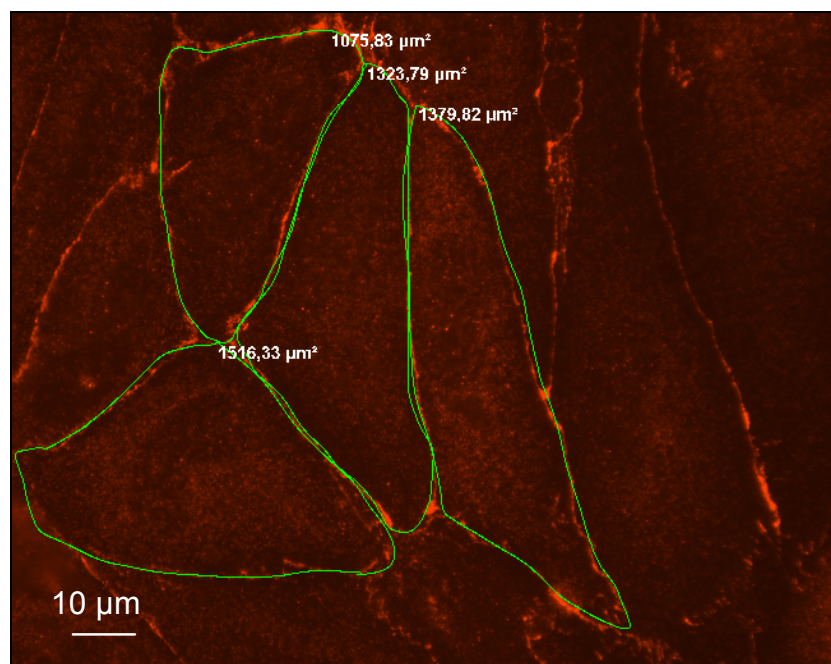
Die absolute Proteinmenge war ein weiteres Kriterium, das zum Vergleich der beiden Passagen herangezogen wurde. Hierbei ist die jeweilige Proteinmenge pro  $\text{cm}^2$  Kulturfläche bestimmt worden (s. 4.6). Bei Passage 0 ergab sich gegenüber Passage 2 eine um 50 % höhere Proteinkonzentration pro kultivierter Fläche (Tab. 5.1).

**Tab. 5.1:** Proteinmenge pro kultivierter Fläche der Passagen 0 und 2.

	Passage 0	Passage 2
<b>Proteinmenge</b> <b><math>[\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}]</math></b>	42,6	29,3

### 5.2.1.3 Bestimmung der Fläche der Zellen

Um den ersten visuellen Eindruck der unterschiedlichen Größe der Zellen von P0 und P2 zu bestätigen (Abb. 5.2), wurden die Flächen der Zellen exakt bestimmt. Hierzu wurden die mit Anti-ZO-1 immungefärbten Zellen, wie sie in Abb. 5.3 und 5.4 dargestellt sind, verwendet. Mittels externen Größenstandards war es möglich, das Mikroskop zu kalibrieren. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellfläche über die Software.



**Abb. 5.6:** Beispiel der Bestimmung der Fläche von Hirnkapillarendothelzellen der Passage 2.

Die Flächenbestimmung ist beispielhaft in Abbildung 5.6 gezeigt. Die Erkennung der Zellränder erfolgte dabei manuell. Auf gleiche Weise wurden die Flächen von DAPI-gefärbten Zellkernen (s. Abb. 5.3 und 5.4) bestimmt. Die Resultate sind in Tab. 5.2 zusammengefasst.

**Tab. 5.2:** *Durchschnittliche Fläche von Zelle und Zellkernen der jeweiligen Passage.*

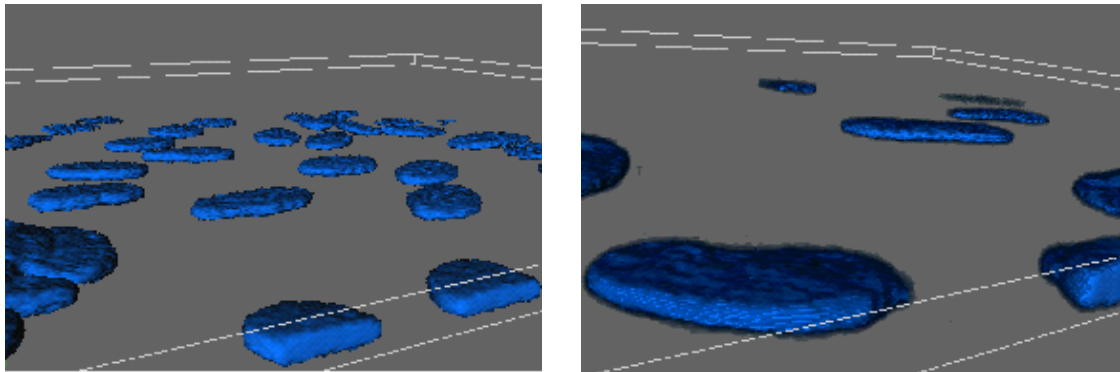
	<b>P0</b>	<b>P2</b>	<b>Quotient der Flächen (P2:P0)</b>
<b>Fläche Zelle [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	434	1324	3,05
<b>Fläche Zellkern [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	101	309	3,05

Durch die Flächenberechnung der Zellen der beiden Passagen bestätigen sich die beschriebenen Beobachtungen im Durchlicht (Abb. 5.2). Sowohl die Flächen der Zellen, als auch die Flächen der Zellkerne sind in Passage 2 durchschnittlich dreimal so groß, wie in Passage 0. Das Verhältnis der Ausdehnung von Zelle zu Zellkern bleibt dabei erhalten.

#### **5.2.1.4 Bestimmung der Oberfläche und des Volumens der Zellen**

Nach der Bestimmung der 2D-Flächen der Zellen waren insbesondere das Volumen und die Oberfläche der Zellen bzw. der Zellkerne beider Passagen von Interesse. Es war zu klären, ob sich das Volumen bei fortschreitender Kultivierung ändert. Weitergehend wurde von den Zellkerne bzw. der Zellen das Verhältnis Oberfläche/Volumen bestimmt.

Für die Festlegung der Abmessungen der Zellkerne wurden die DAPI-Färbungen letzterer untersucht (s. Abb. 5.3 und 5.4). Es wurden die gefärbten Zellkerne der beiden Passagen mit einem konfokalen Laser-Mikroskop untersucht. Dabei erfolgten bis zu 50 Aufnahmen im Abstand von etwa 120 nm in der Z-Ebene der jeweiligen Probe. Über das 3D-Animationsprogramm Imaris3 wurden die Oberfläche und das Volumen der Zellkerne berechnet. Die Berechnung hing jedoch von der Einstellung des Schwellenwertes (*threshold*) ab, der daraufhin bei Bildern mit gleicher Belichtungszeit auf den gleichen Wert eingestellt wurde. Die berechneten Zellkerne sind in den folgenden Abbildungen bei gleicher Vergrößerung dargestellt.



**Abb. 5.7:** Darstellung der berechneten Zellkerne von P0 (links) und P2 (rechts). DAPI-gefärbte Zellkerne wurden mittels konfokaler Mikroskopie visualisiert. Aus der Färbung erfolgte die Ermittlung der Oberfläche und des Volumens mit einer 3D-Software.

Die Oberfläche und das Volumen der Zellkerne wurden zusätzlich noch näherungsweise unter der Annahme bestimmt, dass es sich bei den Zellkernen um Zylinder handelt. Hierzu musste noch die Höhe der Zellkerne über die Aufnahmen des Mikroskops ermittelt werden.

Diese manuelle Berechnung, mit der bei den Zellkernen gemachten Annahme, musste auch bei der Bestimmung der Oberfläche und des Volumens der Zellen der Passage 0 und Passage 2 angewendet werden, da die Zellen mit den Oberflächenfärbungen durch GLUT1- bzw. BXP21- Antikörpern nicht klar untereinander abzugrenzen waren.

**Tab. 5.3:** Durchschnittliche Fläche von Zelle und Zellkernen der jeweiligen Passage.

	P0	P2	Quotient (P2:P0)
OF Zellkerne (autom.) [ $\mu\text{m}^2$ ]	320	820	2,6
OF Zellkerne (man.) [ $\mu\text{m}^2$ ]	370	900	2,4
Vol. Zellkerne (autom.) [ $\mu\text{m}^3$ ]	160	660	4,1
Vol. Zellkerne (man.) [ $\mu\text{m}^3$ ]	290	910	3,1
OF Zellen (man.) [ $\mu\text{m}^2$ ]	970	2900	3,0
Vol. Zellen (man.) [ $\mu\text{m}^3$ ]	1180	3900	3,3

Die ermittelten Werte der automatischen und manuellen Berechnung der Zellkern-Oberflächen stimmen nahezu überein, jedoch trifft dies nicht für die Bestimmung des Volumens zu.

## 5.2 Isolierung der *Lipid rafts*

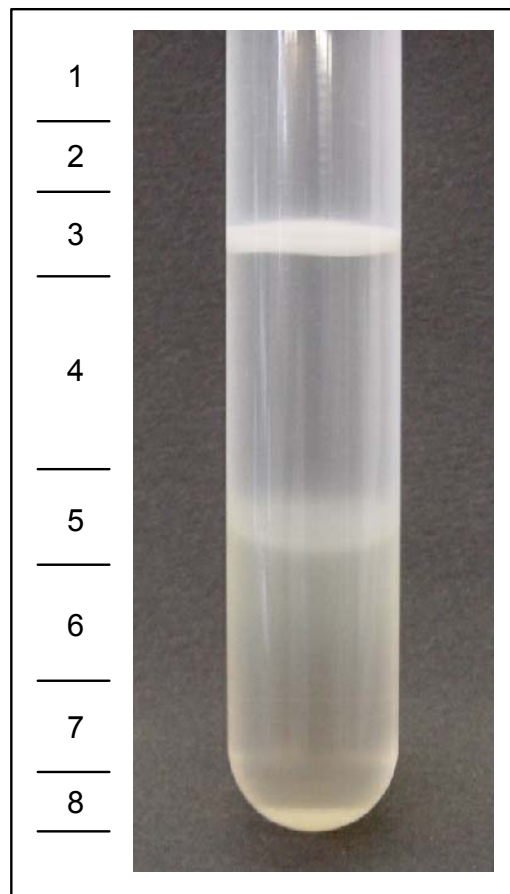
Die *Lipid rafts* wurden als subzelluläre Fraktion isoliert, welche sich bei 4°C nicht in 1%-igen Triton X-100-haltigem Puffer löste und nach einer Gleichgewichtszentrifugation in einem Saccharose-Gradienten aufschwamm (4.3). Die Präparation erfolgte aus Cortex, C6-Zellen, BMEC P0 und BMEC P2.

### 5.2.1 Cortex

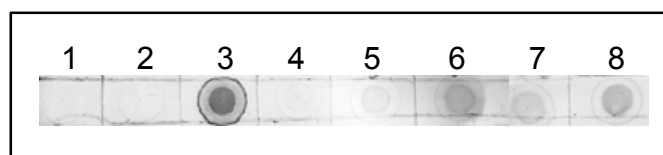
Das Cortex-Gewebe ist auf Zellebene heterogen zusammengesetzt und besitzt einen hohen Lipidgehalt. Es konnte im Gegensatz zu den kultivierten Zellen ohne Limitation des Ausgangsmaterials verwendet werden, was sich daher für die Etablierung der Präparation als besonders geeignet erwies. Wie unter 4.3 beschrieben, wurden 3 g Cortex (Schwein) aufgeschlossen und anschließend 6 Saccharose-Stufen-Gradienten unterschichtet. Nach der Zentrifugation für 18 h bei 140.000 x g war deutlich eine aufschwimmende Bande zu erkennen (Abb. 5.8). Der Gradient wurde durch vorsichtiges Abziehen fraktioniert. Proben der Fraktionen sind anschließend immunchemisch mit Anti-Caveolin-Antikörpern gefärbt worden (4.7.3), wobei das Sediment (Fraktion 8) nicht in Lösung gebracht werden konnte.

Bei der Immunfärbung des Dot-Blots in Abb. 5.9 ist deutlich zu erkennen, dass Fraktion 3 die höchste Färbintensität aufweist. Im Gradienten ist noch Fraktion 5 auffällig, da es sich ebenfalls um eine Bande zu handeln scheint. Jedoch ist im Dot-Blot nahezu keine Reaktion gegen Anti-Caveolin zu sehen. Außerdem ist die Proteinkonzentration gegenüber Fraktion 3 zehnmal geringer (o. Abb.). Zur Konzentrierung der gewünschten Bestandteile der Fraktion 3 wurde die Fraktion in MES-Puffer resuspendiert und bei 100.000 x g sedimentiert. Neben der Konzentrierung erfolgte dadurch eine weitere Reinigung der Fraktion, da zum einen die Saccharose und zum anderen lösliche Proteine weitgehend entfernt wurden.





**Abb. 5.8:** *Saccharose-Gradient nach Gleichgewichtszentrifugation eines Cortex-Aufschlusses in 1%igen Triton-Puffer. Numeriert sind die isolierten Fraktionen.*



**Abb. 5.9:** *Dot-Blot der isolierten Fraktionen (Abb. 5.7) mit Anti-Caveolin-Antikörpern immunchemisch detektiert. Es wurden jeweils 2  $\mu$ L der jeweiligen Fraktion aufgetragen.*

Die Gesamtproteinmenge (4.4) der isolierten Fraktion betrug am Ende 7,5 mg. Die Präparation hat sich somit als effektive Methode zur Isolierung der *Lipid raft*-Fraktion herausgestellt.

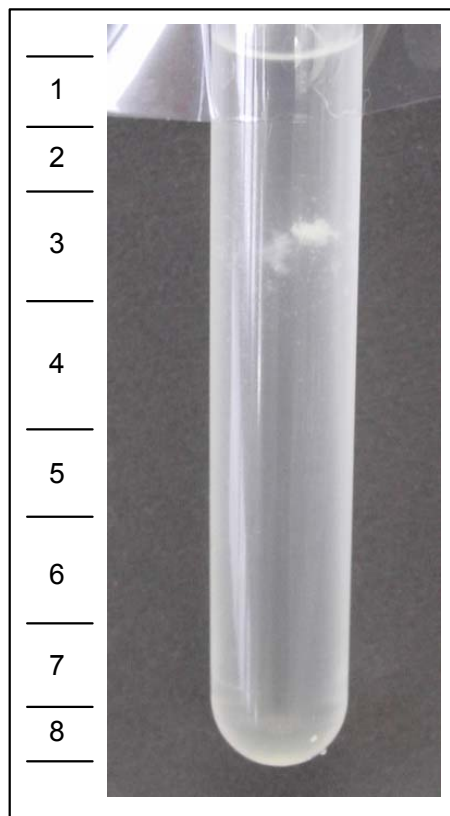


### 5.2.2 C6-Zellen

Durch die Verwendung von C6-Zellen für die *Lipid raft*-Präparation ist auf homogenes Zellkulturmaterial zurückgegriffen worden, welches im Bezug auf die Blut-Hirn-Schranke eine erhebliche Bedeutung besitzt. Denn die Astrozyten bilden zusammen mit den Hirnkapillarendothelzellen und den Perizyten das Kapillarrohr (Abb. 1.2).

Konfluente C6-Zellen aus 60 175-cm<sup>2</sup>-Zellkulturgefäßen wurden zunächst mit PBS<sup>2-</sup> gewaschen und anschließend abgeschabt. Die vereinigten Zellen wurden schließlich in 1%-igem Triton-MES-Puffer aufgeschlossen und mit dem resultierenden Rohextrakt vier Saccharosestufengradienten unterschichtet (4.3).

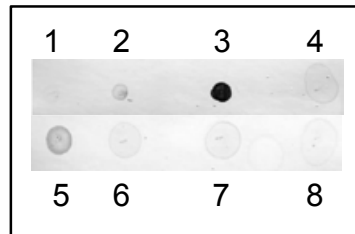
Nach der Zentrifugation war eine „Wolke“ an der Grenze zwischen der 5- und der 30 % igen Saccharose-Lösung im Stufengradienten zu beobachten (Abb. 5.10). Die Isolation der Schichten erfolgte durch vorsichtiges Abziehen von oben nach unten.



**Abb. 5.10:** *Saccharose-Gradient nach dem Aufschluss von C6-Zellen in 1%igem Triton-Puffer. Die einzelnen Fraktionen sind mit Nummern versehen.*

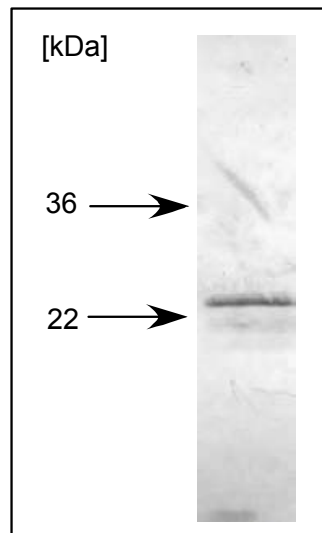
Die isolierten Fraktionen wurden anschließend im Dot-Blot (4.7.1) auf ihre Aktivität gegenüber Anti-Caveolin-Antikörpern untersucht (Abb. 5.11). Hierbei zeigte sich, dass die Fraktion 3 die intensivste Färbung aufwies.

Diese ist in MES-Puffer resuspendiert und bei 100.000 x g sedimentiert worden. Das resultierende Sediment wurde mit 600 µL MES-Puffer aufgenommen und bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert. Die Gesamtmenge (4.4) der isolierten *Lipid raft*-Fraktion betrug ca. 700 µg.



**Abb. 5.11:** Dot-Blot der isolierten Fraktionen (Abb. 5.8) mit Anti-Caveolin-Antikörpern immunchemisch detektiert. Es wurden jeweils 2 µL der jeweiligen Fraktion aufgetragen.

Im mit Anti-Caveolin inkubierten Western Blot (4.7.3) zeigte die am Ende der Präparation erhaltene Probe, dass lediglich eine spezifische Bande bei etwas über 22 kDa gefärbt wurde (Abb. 5.12).



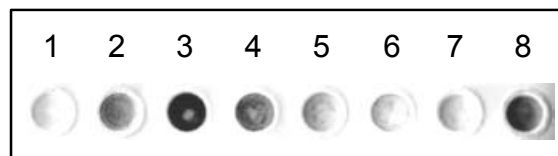
**Abb. 5.12:** Western Blot der C6-Lipid raft-Fraktion mit Anti-Caveolin-Antikörpern immunchemisch detektiert. Es wurden 2,5 µg Protein aufgetragen.

### 5.2.3 Kultivierte Hirnkapillarendothelzellen

Von Passage 0 und Passage 2 der BMECs wurden von jeweils 20 Kulturgefäßen (175 cm<sup>2</sup>), analog zu den C6-Zellen, die *Lipid raft*-Fraktionen (4.3) isoliert. Es sind hierbei jeweils 4 Saccharose-Gradienten beladen worden.

Da auf den dokumentierten Gradienten die isolierte Bande kaum sichtbar war, ist auf eine Abbildung verzichtet worden. Ansonsten hatten die Banden die gleiche wolkenartige Struktur, die auch in Abb. 5.10 zu sehen ist. Die Isolation der Schichten im Gradienten erfolgte ebenfalls analog zu der Präparation der *Lipid rafts* aus C6-Zellen. Ein Blot (4.7.1) der Fraktionen erfolgte mittels der Dot-Blot-Apparatur.

Nach der anschließenden Immunfärbung mit Anti-Caveolin-Antikörpern (4.7.3) ist bei Passage 0 die deutlich stärkste Färbung bei Fraktion 3 (Abb. 5.13) zu beobachten. Die Färbung dieser Fraktion befindet sich bereits in der Sättigung, wobei daneben noch nennenswerte Aktivitäten in den Fraktionen 2,4 und 8 detektiert wurden.

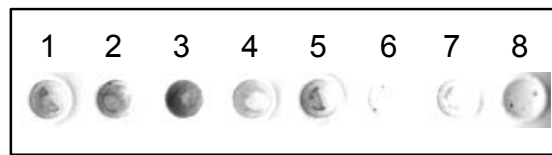


**Abb. 5.13:** Dot Blot der der LR aus Passage 0 mit 7 µL der isolierten Fraktionen in 100 µL TBST-Puffer pro Kavität und eine Anti-Caveolin-Färbung. Die Isolierung der Fraktionen erfolgte aus einem Saccharose-Stufen-Gradienten analog zu Abb. 5.9.

Bei Fraktion 8 handelt es sich um das unlösliche Sediment der Gleichgewichtszentrifugation, welches im Western Blot mit Anti-Caveolin-Antikörpern viele unspezifische Banden zeigt (o. Abb.). Die Fraktionen 2 und 4 wurden vereinigt und entsprechend wie Fraktion 3 in MES-Puffer resuspendiert. Die unlöslichen Bestandteile sind anschließend bei 100.000 x g sedimentiert worden. Da der Rückstand aus den Fraktionen 2 und 4 vernachlässigbar war, wurde er verworfen. Das Sediment aus Fraktion 3 wurde in MES-Puffer aufgenommen und bei –80°C bis zur weiteren Untersuchung gelagert.

Bei der Isolierung der *Lipid rafts* aus Hirnkapillarendothelzellen der Passage 2 waren sowohl die Bande in Fraktion 3, als auch das Sediment am Ende der Präparation deutlich kleiner. Das Sediment wurde ebenfalls bei –80°C zur weiteren Analyse gelagert. Die Intensität der Färbung (Abb. 5.14) durch Anti-Caveolin-Antikörper fällt bei

gleichen Volumina ebenfalls geringer aus. Jedoch befindet sich auch hier die größte Aktivität gegenüber dem Caveolin-Antikörper in Fraktion 3.



**Abb. 5.14:** Dot Blot der isolierten Fraktionen aus Passage 2 mit anschließender Immunfärbung mit einem Antikörper gegen Caveolin. Es wurden 7  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Fraktion in 100  $\mu\text{L}$  TBST-Puffer auf die Membran aufgetragen. Die Fraktionen wurden aus einem Saccharose-Stufengradienten analog zu Abb. 5.10 isoliert.

Durch die Bestimmung der Gesamtproteinmenge (Tab. 5.5) der beiden Fraktionen wurden die Eindrücke der unterschiedlichen Sedimentgröße nach dem letzten Zentrifugationsschritt und die unterschiedlichen Färbeintensitäten nach der Immunfärbung bestätigt. Die isolierte Proteinmenge aus Passage 0 war fünfmal höher, als die aus Passage 2.

**Tab. 5.5:** Gesamtproteinmenge der Lipid rafts aus Passage 0 (P0LR) und Passage 2 (P2LR).

	P0LR	P2LR
<b>Proteinmenge [mg]</b>	1,0	0,2

### 5.3 Effektivität der Reinigung von *Lipid rafts* aus kultivierten BMECs

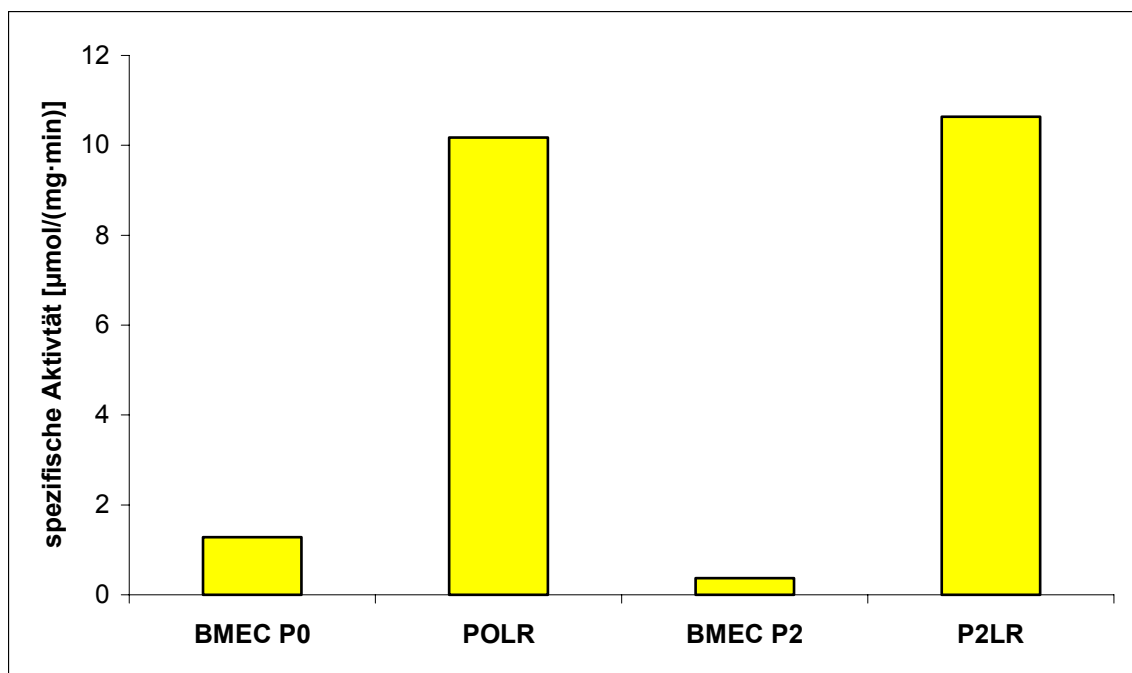
Wie in 5.2.3 beschrieben, unterscheidet sich die absolute Menge der isolierten *Lipid raft*-Fraktionen von P0 und P2 aus den kultivierten Hirnkapillarendothelzellen um den Faktor fünf. Dies lässt jedoch keine Aussage hinsichtlich der Qualität der Präparation zu, da zunächst überprüft werden muss, wie spezifisch die Isolation aus P0 erfolgte. Dazu wurde die spezifische Aktivität der Alkalischen Phosphatase (s. 4.7), welche als GPI-verankertes Enzym in der Fraktion angereichert werden sollte, bestimmt. Zusätzlich ist ein Western Blot gegen das Markerprotein Caveolin durchgeführt worden.

In Tab. 5.6 ist in den LR-Fractionen (P0LR und P2LR) eine deutliche Zunahme der spezifischen Aktivität der Alkalischen Phosphatase zu beobachten. Die Aktivität in Passage 0 nahm durch die Präparation um den Faktor 8 und bei Passage 2 um den Faktor 28 zu.

**Tab. 5.6:** *Spez. Aktivität der Alkalischen Phosphatas in Rohaufschluss der Passagen 0 und 2 (BMEC P0 und BMEC P2) und in den jeweiligen LR-Fractionen (P0LR und P2LR).*

Fraktion	BMEC P0	P0LR	BMEC P2	P2LR
spez. Aktivität [ $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ]	1,28	10,17	0,37	10,64

Aus den tabellarischen Werten resultiert folgendes Diagramm:

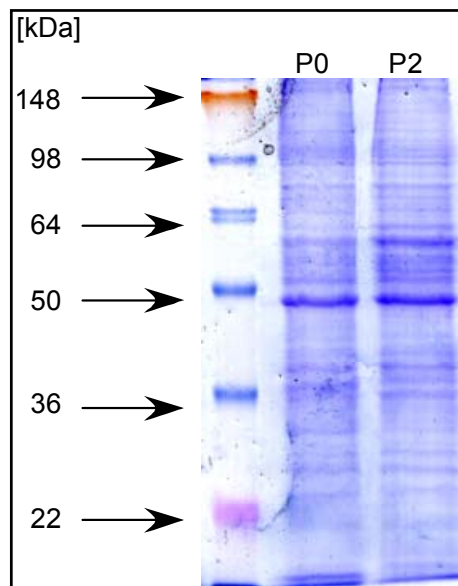


**Abb. 5.15:** *Spezifische Aktivität der Alkalischen Phosphatase von Hirnkapillar-endothelzellen aus Passage 0 und Passage 2 (BMEC P0 und BMEC P2) im Vergleich zur jeweils isolierten Lipid raft-Fraktion (P0LR und P2LR).*

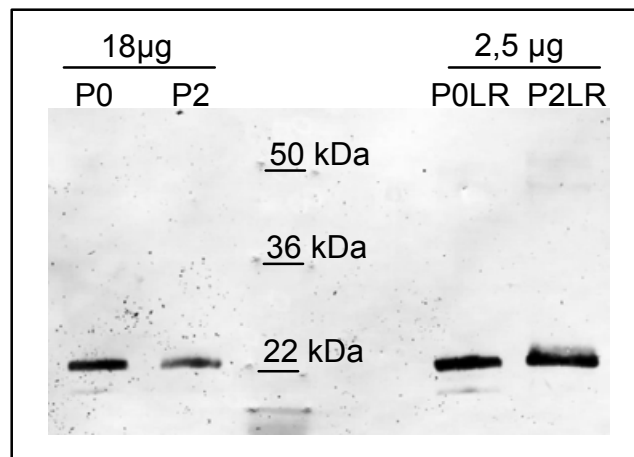
Bei dem Western Blot mit anschließender Immunfärbung durch Anti-Caveolin-Antikörper war es wichtig, dass die gleiche Proteinmenge in beiden Spuren aufgetragen wurde.

Das exakte Verhältnis der Auftragsmengen der Rohlysate, bzw. der LR-Fractionen wurde mittels Coomasiefärbung (4.6.1.1), bzw. SyproRuby (4.6.1.3) parallel zur Immunfärbung, gelelektrophoretisch (4.6) überprüft (Abb. 5.15 und 5.20). Dabei ist die

identische Auftragsmenge bestätigt worden. Ein möglicher Fehler bei der Proteinbestimmung (Tab. 5.1) war somit auszuschließen.



**Abb. 5.16:** Coomassie gefärbtes Polyacrylamid-Gel von Gesamtprotein aus P0 und P2. Es wurden jeweils 18 µg Protein aufgetragen.



**Abb. 5.17:** Western Blot von den Rohaufschlüssen der Passage 0 und 2 (P0 und P2) mit jeweils 18 µg aufgetragenem Protein (links) gegenüber den isolierten Lipid raft-Fraktionen beider Passagen (P0LR und P2LR; rechts; jeweils 2,5 µg Protein aufgetragen)

Die gefärbte Bande bei 22 kDa im Western Blot (Abb. 5.17) entspricht jeweils dem detektierten Caveolin. Beim Vergleich der beiden Rohaufschlüsse fällt auf, dass trotz gleicher Proteinmenge die Bande in Spur P0 intensiver ist, als die in Spur P2. Die Intensitäten der Banden aus beiden LR-Fraktionen sind gleich.

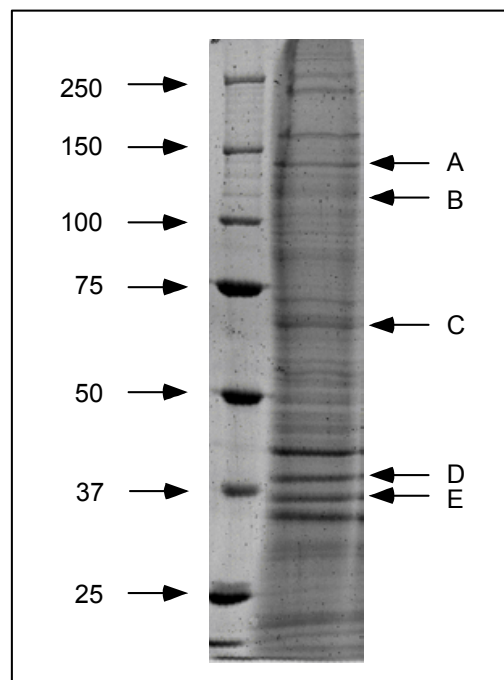
Von dem Gesamtprotein der beiden Passagen wurde 7,2 mal mehr Protein aufgetragen, als von der präparierten LR-Fraktion. Trotzdem resultiert daraus eine geringere Färbeintensität. Dabei ist der Unterschied von P0 zu P0LR geringer, als von P2 zu P2LR. Dies spiegelt die Ergebnisse aus der Bestimmung der spezifischen Aktivität der Alkalischen Phosphatase in Abb. 5.15 wieder.

## 5.4 Massenspektrometrische Analyse der *Lipid raft*-Fraktion

### 5.4.1 SDS-Gel und MALDI-Analyse der LR von C6-Zellen

Zur Identifizierung der Proteine mussten diese zunächst über die Gelelektrophorese getrennt und anschließend mittels Massenspektrometrie analysiert werden. Die 2D-Elektrophorese schied aufgrund der schlechten Löslichkeit der Membranproteine aus. Daher erfolgte die Trennung zunächst über ein SDS-Gel (4.6).

Vor der Analyse der isolierten Membranfragmente war zunächst eine entsprechende Vorbereitung der Probe für das Gel nötig. Hierzu wurde das Äquivalent zu 55 µg Gesamtproteinmenge der in MES-Puffer resuspendierten *Lipid raft*-Präparation in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C und 20.000 x g für 10 min sedimentiert. Das resultierende Sediment wurde in 20 µL SDS-Auftragspuffer aufgenommen und nach zweiminütigem Erhitzen (95°C) auf das 7,5-12,5%ige Gradientengel aufgetragen. Nach dem Gellauf erfolgte die Färbung mit SyproRuby (Abb. 5.18) und die 5 daraus isolierten Banden wurden mittels MALDI (4.8.3) analysiert (Tab. 5.4). Die gleiche Proteinmenge wie in der gezeigten Abbildung 5.18 wurde in einer Nachbarspur aufgetragen. Nach dem Lauf wurden diese jedoch nicht fixiert, sondern gleich in 37 nahezu gleichgroße Banden geschnitten und die jeweiligen Banden zu weiteren Analyse in silikonisierten Reaktionsgefäßen bei –80°C gelagert.



**Abb. 5.18:** Lipid raft-Fraktion von C6-Zellen auf einem 7,5-12,5%igen Polyacrylamidgel. Die aufgetragene Proteinmenge entsprach 55 µg. Die Buchstaben kennzeichnen die mittels MALDI analysierten Banden (A-E).

**Tab. 5.7:** Mittels MALDI identifizierte Proteine; Bezeichnung der Banden aus Abb. 5.18.

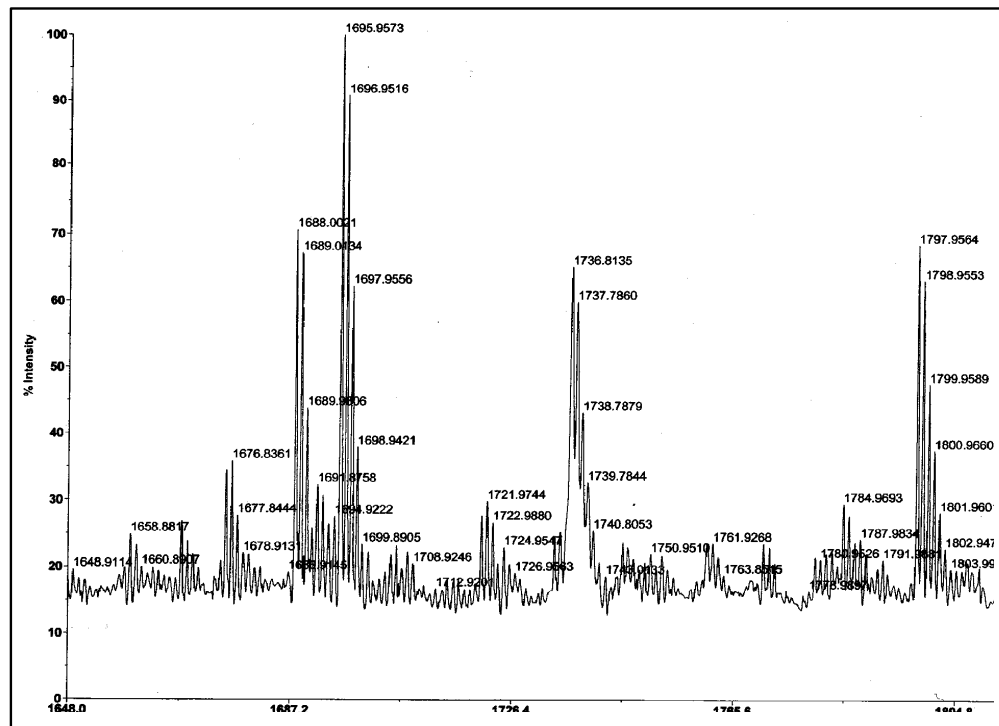
Bande	Molekulargewicht [Da]	Protein
A	123670	GPI-anchored ceruloplasmin
B	80246	Neural cell adhesion molecule 1
C	63928	5' nucleotidase
D	41635	actin gamma
E	40445	Guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha-2 subu.

Bei der Auswertung der MALDI-Analyse ist gegenüber früheren Messungen von Proben aus 2D-Gelen aufgefallen, dass die Spektren sehr viel mehr Signale enthalten. Bei der Vergrößerung eines Massenbereichs in einem beliebigen Spektrum (Abb. 5.19) sind im sog. Untergrundrauschen sehr viele Peptidmuster zu erkennen. Aufgrund der Vielzahl dieser Peaks konnte nicht mehr davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei nur um die in einem einzigen Protein enthaltenen Peptide handelt, sondern



dass sich mehrere Proteine in der Probe befinden. Mittels normaler Suchmasken ist die Vielzahl der Signale daher nicht auszuwerten.

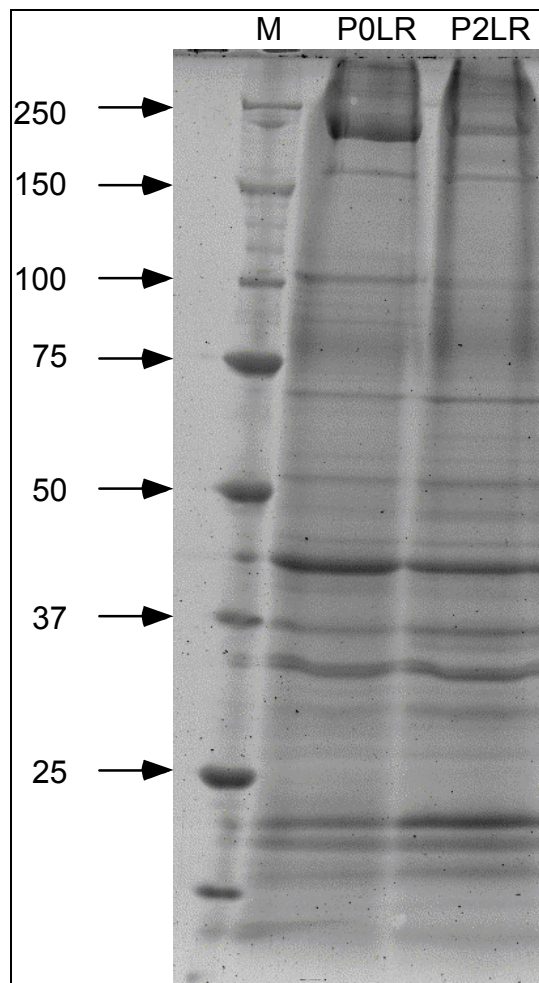
Um das Spektrum zu vereinfachen, mussten die Proteine, oder vielmehr die Peptide des tryptischen Verdaus daher zur Identifizierung weitergehend getrennt werden. Darüber hinaus kann bei Kenntnis der Sequenz einzelner Peptide die Trefferwahrscheinlichkeit in der Datenbank erhöht werden.



*Abb. 5.19: Ausschnitt aus dem MALDI-Spektrum einer eluierten Bande. Das vermeintliche Untergrundrauschen zeigt noch deutlich ein Peptidmuster.*

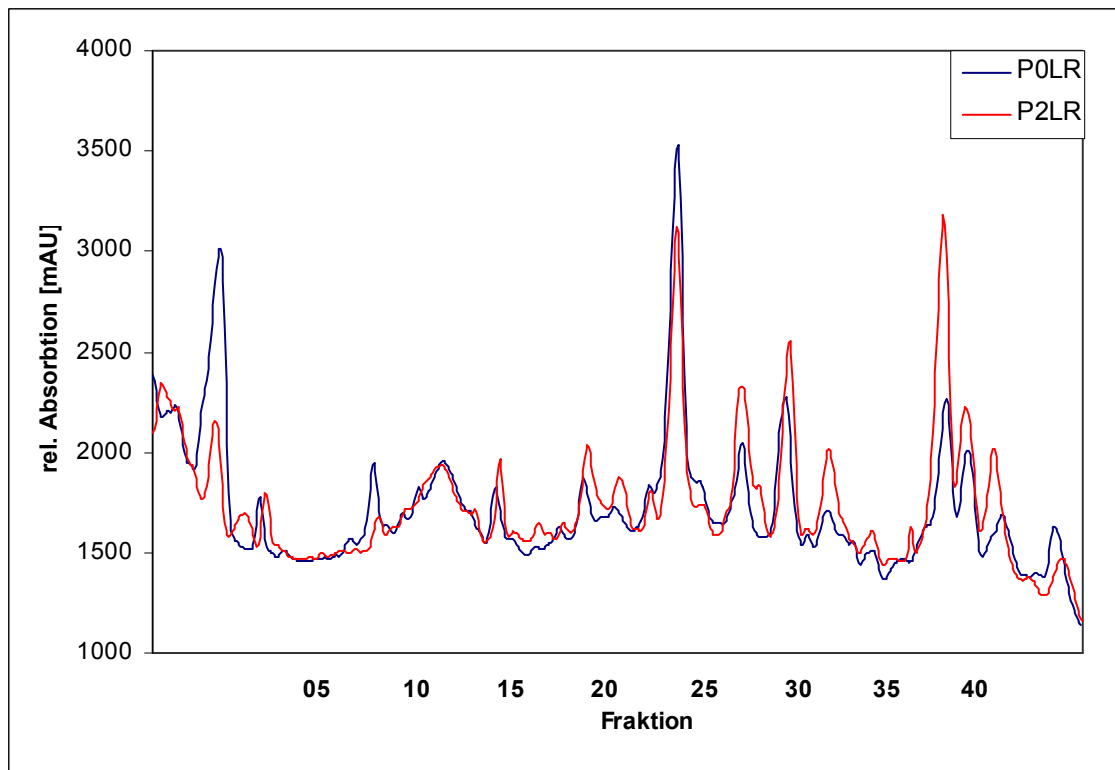
#### 5.4.2 SDS-Gel der LR-Fraktion von Passage 0 und 2 der BMEC

Bei der Bearbeitung der Proben aus den präparierten Passagen wurde analog zur Untersuchung der C6-LR (5.4.1) vorgegangen. Dieses bezieht sich sowohl auf die Probenvorbereitung, als auch auf die Färbemethode. Die Spuren P0LR und P2LR des gefärbten (4.6.1.3) und dokumentierten Gels wurden in 42 gleichgroße Banden geschnitten, wobei gleich nummerierte Banden der beiden Fraktionen auf der gleichen Höhe zu liegen kamen. Die isolierten Proben wurden bis zur weiteren Analyse in silikonisierten Reaktionsgefäßen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.



**Abb. 5.20:** Mit SyproRuby gefärbtes 7,5-12,5%igen SDS-Gel der LR-Fraktion aus kultivierten Hirnkapillarendothelzellen der Passagen 0 (links) und 2 (rechts). Es wurden jeweils 60 µg Protein pro Spur aufgetragen.

Ein Ziel der Arbeit war es, festzustellen, ob Unterschiede zwischen den beiden Passagen auf der Ebene der *Lipid rafts* existieren. Auf den ersten Blick ist bei gleicher Auftragsmenge das Muster identisch. Das dokumentierte Gel wurde daher mit der Software Aida 2.4.3 genauer analysiert. Hierzu wurden die Graustufen der dokumentierten Färbung über die 42 ausgeschnittenen Banden zweidimensional dargestellt (Abb. 5.21). Die Numerierung verläuft, ausgehend von Abb. 5.19 von oben nach unten.



*Abb. 5.21: Relative Absorption der gefärbten Banden aus Abb. 5.18 gegen die isolierten Fraktionen der jeweiligen Passage.*

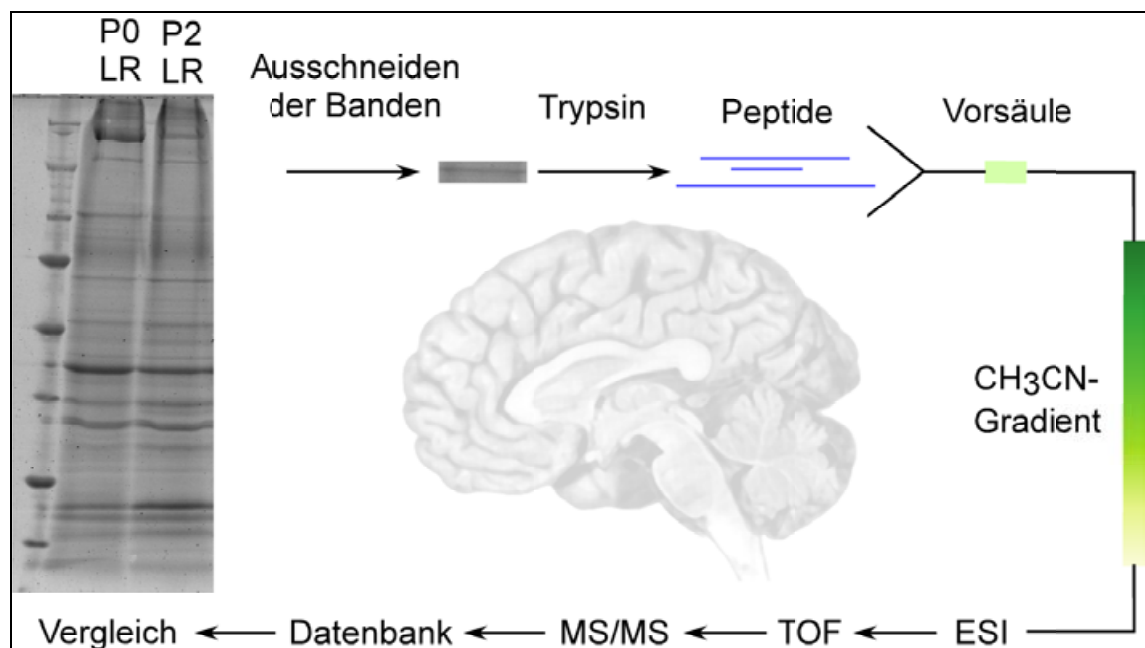
Es bestätigt sich der erste visuelle Eindruck, dass keine qualitativen Unterschiede bei den intensivsten Banden (höher als 1800 in Abb. 5.20) zwischen den beiden Fraktionen bestehen. Bei Fraktion 7, die einer molekularen Masse von ca. 110-120 kDa entspricht, ist ein kleiner Peak bei P0LR zu erkennen, der bei P2LR nicht vorhanden ist. Ansonsten handelt es sich überwiegend um quantitative Unterschiede. Am auffälligsten ist dieser Unterschied bei Fraktion 3 (ca. 230 kDa). Diese Bande besitzt in Passage 0 mehr als doppelte Intensität gegenüber Passage 2. Einen nahezu umgekehrten Effekt beobachtet man bei Fraktion 37 (ca. 22 kDa). Hier ist die Färbung in P2LR deutlich stärker, als in P0LR.

### 5.4.3 GeLC-MS

Wie unter 5.4.1 beschrieben, ist die Analyse der ausgeschnittenen Banden der SDS-Polyacrylamidgele von LR-Fractionen von kultivierten Hirnkapillarendothelzellen der Passagen 0 und 2, sowie von C6-Zellen mittels MALDI nur bedingt möglich. Die

Trennung auf einem eindimensionalen Gel (4.6) verläuft aufgrund der komplexen Proteinmischung nur unzureichend. Es wurde daher eine Methode etabliert, mit der die aus dem tryptischen Verdau einer Bande resultierenden Peptide säulenchromatographisch getrennt und anschließend massenspektrometrisch analysiert werden konnten. Diese Methode wird als GeLC-MS bezeichnet. Abgeleitet ist dieser Begriff von der durchgeführten Gelelektrophorese (4.6) mit nachfolgender *liquid chromatography* (LC) und daran gekoppelter Massenspektrometrie (MS) (4.8.4). Im Anschluss an eine Datenbankrecherche folgte die Auswertung der Ergebnisse.

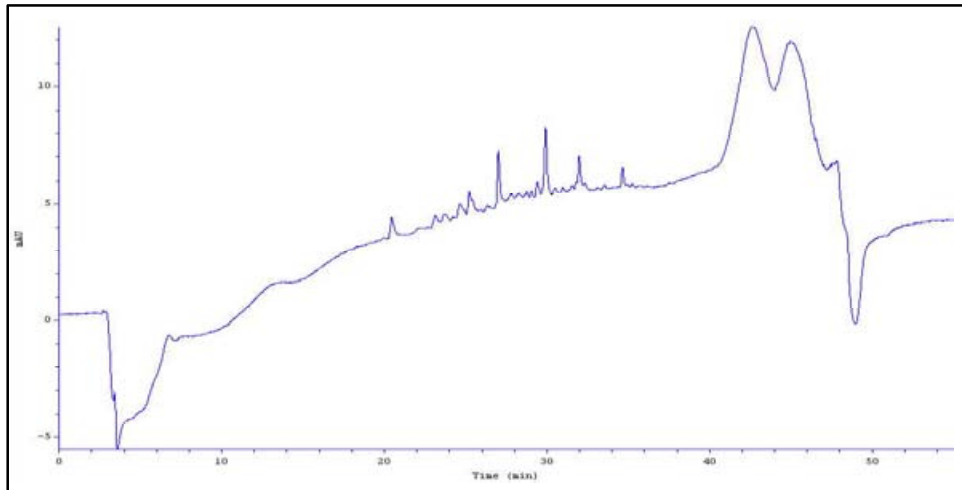
In Abb. 5.22 ist ein Fließschema der vergleichenden Analyse von P0LR und P2LR dargestellt. Für die Analyse der LR-Fraktion von C6 wurde analog vorgegangen und die Ergebnisse schließlich mit denen der beiden anderen Proben verglichen. Die massenspektrometrische Methode wird im weiteren noch einmal gesondert erläutert (5.4.4).



**Abb. 5.22:** Schema der vergleichenden Analyse von P0LR und P2LR über GeLC-MS. Nach einem Vergleich der Bandenmuster werden die einzelnen Banden ausgeschnitten. Die Proteine werden durch Trypsin hydrolysiert und auf eine Vorsäule gegeben. Nach der Trennung in einem Acetonitril-gradienten erfolgte die Analyse der Peptide im ESI-MS. Mit den TOF- und MS/MS-Spektren werden über Datenbanken die Proteine identifiziert und die Daten wiederum miteinander verglichen.

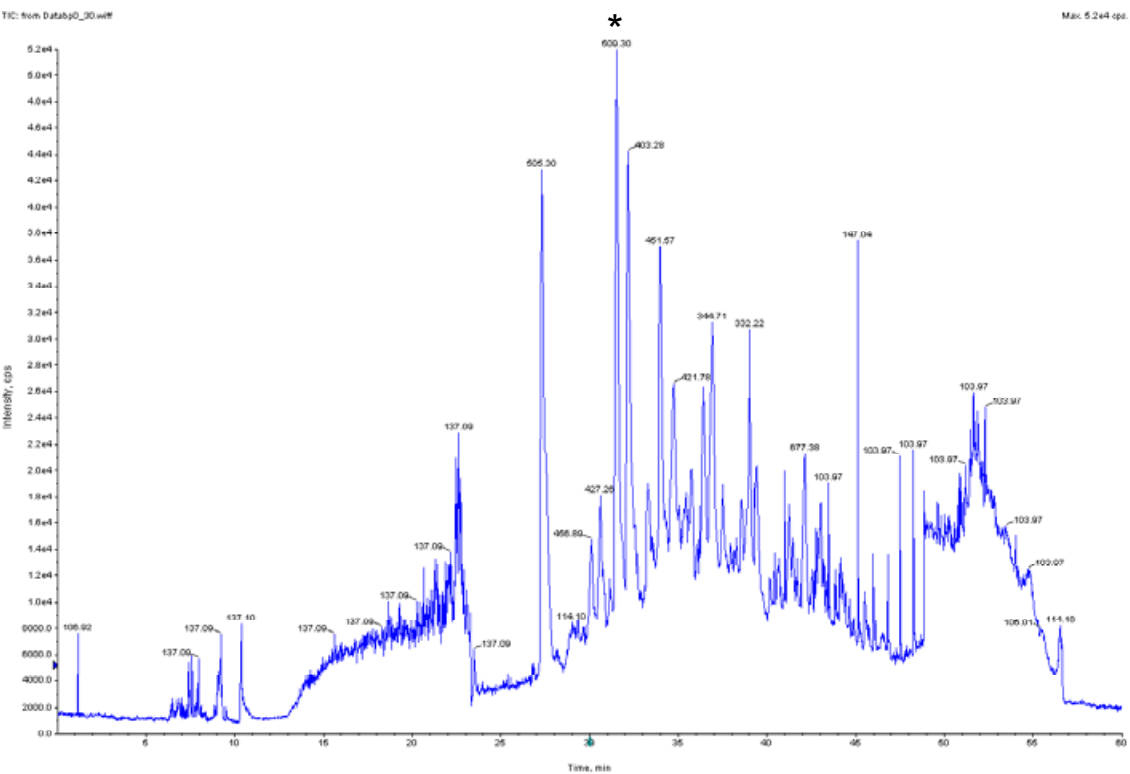
#### 5.4.4 Darstellung der LC-MS-Experimente

Am Beispiel der Bande 30 (ca. 35 kDa) von P0LR (P0LR\_30) soll die Vorgehensweise erläutert werden. Die Bande wurde ausgeschnitten und nach dem tryptischen Verdau, wurden die resultierenden Peptide wie in 4.8.4 beschrieben, auf die HPLC aufgetragen. Das nach der Trennung resultierende UV-Spektrum ist in Abb. 5.23 dargestellt.

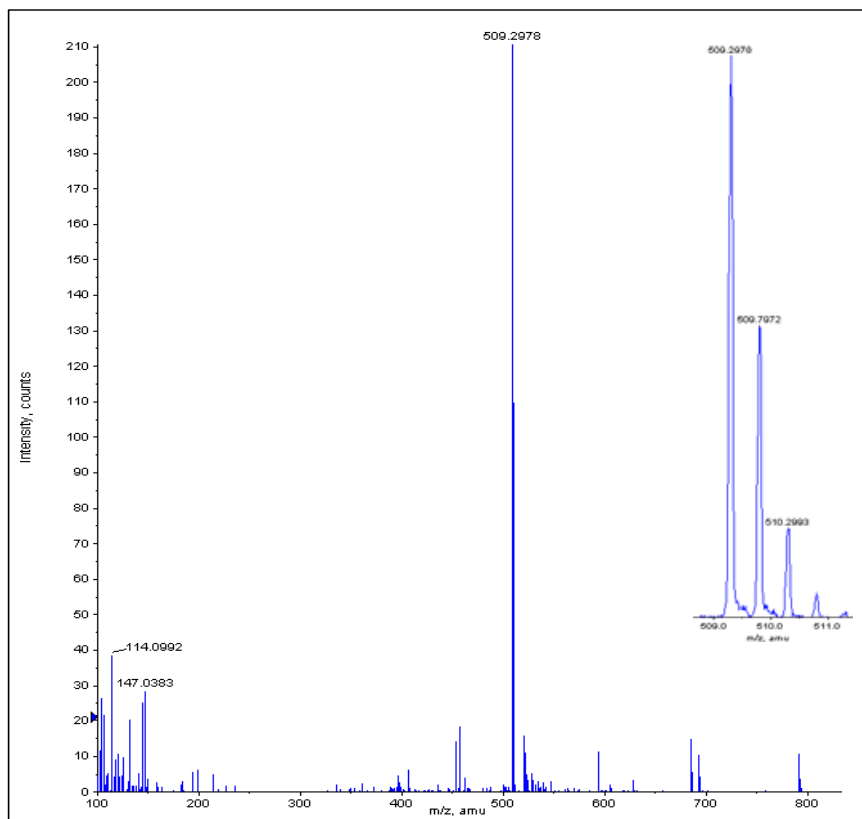


*Abb. 5.23: Absorption des getrennten Peptidgemisches aus P0LR\_30 bei 214 nm gegen die Retentionszeit aufgetragen.*

Die Peptide eluierten in einem Bereich von 20 bis 35 min. Die nachfolgenden Signale ab 40 min resultierten vom Spülen der Säule und zeigten keine Peptidmuster im Massenspektrum. Vergleichend dazu ist der Gesamtionenstrom in Abb. 5.24 zu sehen. Während der Messung wurde kontinuierlich die Summe der im TOF-Modus detektierten Ionen bestimmt. Über einen Bereich von 60 min sind 3600 Massenspektren aufgenommen worden. Durch die Software konnte der Ionenstrom zu einem beliebigen Zeitpunkt aufgelöst werden, um die „darunterliegenden“ Massenspektren zu erhalten. Exemplarisch wurde dies am Peak 509,3 (mit \* in Abb. 5.24 gekennzeichnet) demonstriert, der eine Retentionszeit von rund 32 min besitzt (Abb. 5.25).



**Abb. 5.24:** Gesamtionenstrom des Peptidgemisches von P0LR\_30 nach Trennung mit der HPLC. Aufgetragen ist die Intensität in counts per second gegen die Zeit in min. Mit \* ist ein in Abb. 5.25 vergrößerter Bereich gekennzeichnet.



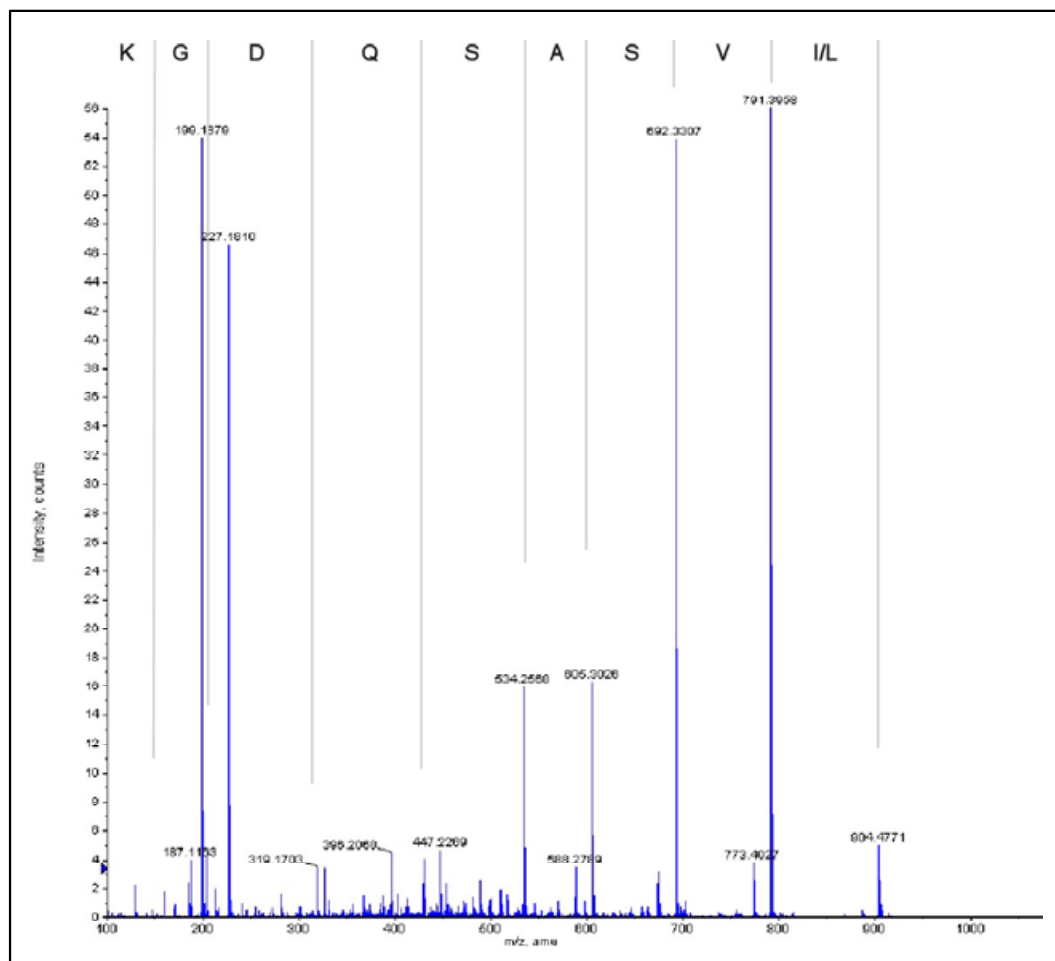
**Abb. 5.25:** Massenspektrum eines Peptids bei 509,3 m/z. Bei Vergrößerung des Basispeaks (rechts oben) sieht man das Isotopenmuster.

Der Basispeak besitzt das Masse-zu-Ladungsverhältnis von  $m/z$  509,29. In der Vergrößerung dieses Peaks kann neben dem monoisotopischen Peptid auch das Peptid mit ein, zwei, drei und u. U. auch noch das mit vier  $^{13}\text{C}$  erkannt werden. Aufgrund des Abstands von  $m/z$  0,5 der Signale lässt sich das Ion als zweifach geladen bestimmen.

Der Peak erfüllte somit die in 4.8.4.2 beschriebenen Bedingungen, so dass vom TOF-Modus des Massenspektrometers automatisch in den MS/MS-Modus umgeschaltet wurde. Es folgten die Fragmentierung und die Detektion der positiv geladenen Bruchstücke.

In Abb.5.26 ist das Fragmentierungsmuster des Peptids mit  $m/z$  509,3 dargestellt. Der überwiegende Teil der detektierten Fragmentionen rührt vom  $y$ -Zerfall her. Aufgrund des regelmäßigen Zerfallsmusters kann die Sequenz des Peptids aus den Abständen der Signale ermittelt werden. Mit Hilfe der Masse des Mutterions ( $m/z$  1017,6), die bereits vor der Fragmentierung erhalten wurde, resultierte folgende Sequenz: Ile/Leu – Ile/Leu – Val – Ser – Ala – Gln – Asp – Gly – Lys.

Eine Unterscheidung zwischen Isoleucin und Leucin ist im MS/MS-Modus aufgrund der identischen Masse beider Aminosäuren nicht möglich. Die Ermittlung der Sequenz erfolgte zur Veranschaulichung in diesem Falle manuell. Aufgrund der Vielzahl der Daten wurden die Peaks im Allgemeinen von der Software automatisch detektiert und in der nachfolgenden Datenbankrecherche (4.8.4.2) der vorher aufgestellten Peakliste, möglichen Sequenzen zugewiesen und mit einem sog. *Score*, d.h. einer Trefferpunktzahl belegt. Hierbei ist es um so wahrscheinlicher, dass die Peakliste dem gefundenen Peptid entspricht, je höher der *Score* des Treffers ist.



**Abb. 5.26:** MS/MS-Spektrum des Peptids 509,3 (Abb. 5.23) mit der manuell aus den Abständen der y-Ionen ermittelten Sequenz.

1. [gi16680045](#) Mass: 37353 Total score: 152 Peptides matched: 6  
guanine nucleotide-binding protein, beta-1 subunit [Mus musculus]  
☐ Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">2</a>	403.28	804.54	804.50	0.04	0	18	1	VHAIPLR
<a href="#">9</a>	448.30	894.58	894.54	0.04	1	24	7	TLRGHLAK
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">13</a>	505.28	1008.55	1008.51	0.04	0	27	1	AGVLAGHDNR
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">14</a>	509.30	1016.60	1016.55	0.05	0	25	1	LLVSASQDGK
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">38</a>	678.88	1355.75	1355.72	0.03	1	46	1	QEAEQLKNQIR
<a href="#">73</a>	696.72	2087.14	2086.05	1.09	1	14	3	KACADATLSQITNNIDPVGH

**Abb. 5.27:** Teil des Ergebnisses der MASCOT-Datenbankabfrage von P0LR\_30. Darin enthalten sind die resultierende Masse des Peptids (Mr (expt.)), die theoretische Masse (Mr (calc.)), die Abweichung von der theoretischen Masse (Delta, in Da), unvollständige Hydrolyse durch das Trypsin (Miss), die Gesamt-Trefferpunktzahl (Score), eine Bewertung der Qualität des Treffers (Rank) und die Sequenz des zugewiesenen Peptids (Peptide).



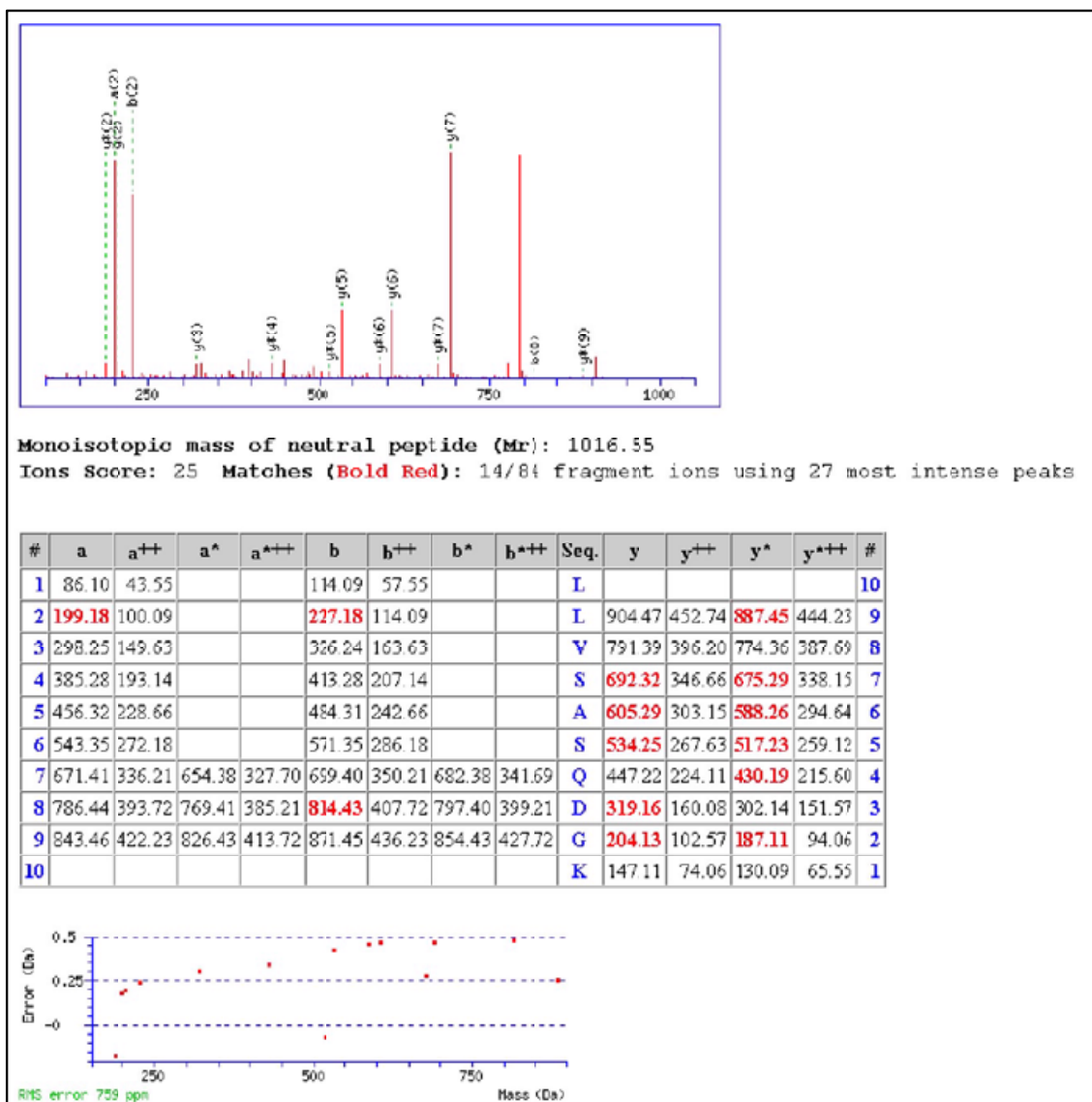
Bei einer Datenbankrecherche erfolgte die Analyse der Peaklisten eines kompletten Laufes auf Treffer hin. Ziel war es hierbei, mittels mehrerer Peptide ein Protein in einer Bande zu identifizieren. Im Falle von POLR\_30 wurden 4 Proteine sicher in dieser Bande identifiziert, wobei das Peptid  $m/z$  509,3 der  $\beta$ -Untereinheit eines GTP-bindenden Proteins zugewiesen werden konnte (Abb. 5.27). Es war dabei eines von 6 erkannten Peptiden dieses Proteins. In dieser Ausgabedatei sind die Ergebnisse der TOF-Experimente aufgelistet.

Wenn das Peptid in der Ausgabedatei angewählt wird (über *Query*), gelangt man zu der Auswertung des MS/MS-Experiments, dessen Ergebnis den *Score* bildet.

Im abgebildeten, künstlichen Spektrum (Abb. 5.28; oben) werden sowohl die Lage, als auch die Intensität des Originalspektrums (vgl. mit Abb. 5.26) wiedergegeben. In der darunterliegenden Tabelle sind alle theoretischen Fragment-Ionen des Peptids mit der Sequenz LLVSASQDGK enthalten. Es wurden jedoch nur die rot markierten Zahlen dem Spektrum zugewiesen. Zu den nicht erkannten Signalen gehörten der Basispeak und das Mutterion, welche bei der Abfrage nicht berücksichtigt werden konnten. Allerdings sind die Spaltprodukte bei  $m/z$  199 und  $m/z$  227 anderen Zerfallsmechanismen zugeordnet worden (1.3). Im unteren Teil der Abb. 5.27 sind schließlich die Abweichungen zwischen experimenteller und theoretischer Masse aufgezeigt.

Im Vergleich zur manuellen Auswertung ist die automatische Auswertung nicht nur sehr viel schneller, sondern auch sehr viel variabler, was die Erkennung der Ionen aus unterschiedlichen Fragmentierungsmechanismen angeht. Allerdings werden „offensichtliche“ Signale teilweise nicht dem MS/MS-Spektrum zugewiesen und damit der Datenbank-Abfrage zugeführt.

Im Allgemeinen wurde die Analyse der Daten der LC-MS-Experimente automatisch durchgeführt. In Grenzfällen wurden die Ergebnisse jedoch manuell kontrolliert, um die automatische Identifizierung gegebenenfalls zu korrigieren.



**Abb. 5.28:** Auswertung des MS/MS-Experiments des Peptids m/z 509,3 aus P0LR\_30. Oben das MS/MS-Spektrum, welches automatisch generiert wurde; in der Mitte stellen die Zahlen die theoretischen Fragment-Ionen dar. Rot sind die im Spektrum identifizierten Ionen markiert. Unten ist die Abweichung der gemessenen Fragmente von ihrer theoretischen Masse aufgetragen.

## 5.5 Ergebnisse der LC-MS Analyse

Im Zuge der Arbeit erfolgte die Analyse der Proben der drei LR-Fractionen, aus C6, BMECP0 und BMECP2 nach gelelektrophoretischer Trennung mittels LC-MS. Die Ergebnisse der Datenbankrecherche sind im Anhang I tabellarisch aufgelistet. Mit allen als hypothetische Proteine gekennzeichneten Treffern wurden eine Datenbankabfrage

mit dem BLAST-Algorithmus durchgeführt, um gegebenenfalls DNA-Sequenzen zu ermitteln, die mit den identifizierten Protein-Sequenzen übereinstimmten.

Ein Ziel der massenspektrometrischen Untersuchungen bestand darin, auf qualitativem Wege Proteine zu identifizieren, die lediglich in der *Lipid raft*-Fraktion der Passage 0 von kultivierten Hirnkapillarendothelzellen auftraten. Hierzu wurden zunächst die Ergebnisse aus den Passagen 0 und 2 (Anhang, Tab. I.2 und Tab. 1.3) miteinander verglichen.

Als zusätzliche Vergleichsmöglichkeit wurden die Ergebnisse der Analyse der LR-Fraktion von C6-Zellen (Anhang, Tab. I.1) hinzugezogen. So wurden letztlich 4 Kandidaten gefunden, die nur in Passage 0 exprimiert zu sein schienen: hypothetical protein FLJ20625 (M: 17744 Da), related RAS viral (r-ras) oncogene homolog (M: 23466 Da) Tropomyosin 5 (M: 29003 Da) und Tropomodulin 3 (M: 39556 Da), wobei die letzten drei Proteine nach einer Datenbankrecherche, aufgrund ihres ubiquitären Auftretens (Datenbank: Genecards) als nicht spezifisch angesehen werden konnten. Daher folgten lediglich beim ersten Kandidat weitere Untersuchungen.

Neben dem hypothetischen Protein erfolgte eine weitere Charakterisierung von Caveolin-1, GLUT1 und ABCG2.

## 5.6 Charakterisierung von identifizierten Proteinen

Die vier ausgewählten Proteine wurden, wenn möglich, mittels Western Blot, Immunhistochemie und *Real time*-PCR untersucht.

Über den Western Blot wurden mit einem Antikörper die Existenz und die Größe unterschiedlicher Isoformen untersucht. Mit der Immunhistochemie war die subzelluläre Lokalisation und unter Umständen eine Co-Lokalisation zu bestimmen. Außerdem konnten über die Intensitäten der Färbung Rückschlüsse auf die Expressionsraten der jeweiligen Proteine gezogen werden.

Bei der sog. *Real time*-PCR erfolgte die Bestimmung der Menge der eingesetzten DNA in einer PCR quantitativ. Dadurch wurde schließlich die relative Menge eines Transkriptes bestimmt.

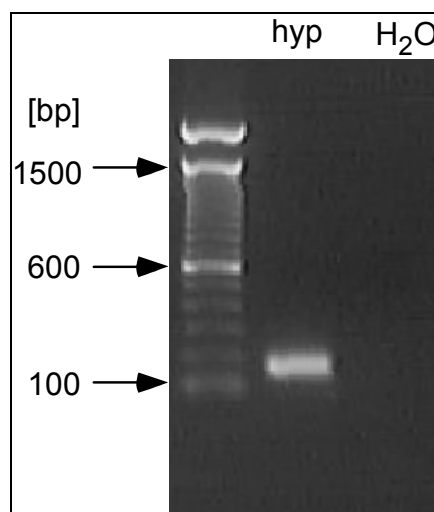
Durch den Vergleich der Immunfärbungen und den *Real time*-Ergebnissen können Hinweise darüber erhalten werden, auf welcher Ebene die Proteine reguliert werden: Transkriptions- und/oder Translations-Ebene.

### 5.6.1 Hypothetisches Protein FLJ20625

Das Hypothetische Protein FLJ20625 wurde im LC-MS-Experiment mit einem Score von 60 und 2 Peptide lediglich in P0\_LR identifiziert. Die Höhe der Bande stimmte dabei mit der theoretischen Masse überein. Bei dem Hypothetischen Protein FLJ20625 konnte weder Western Blot noch immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt werden, da kein Antikörper zur Verfügung stand. Allerdings konnte die Menge des Transkriptes in verschiedenen Zuständen der Hirnkapillarendothelzellen bestimmt werden. Anhand dieses Beispiels wird die Auswertung der *Real time*-PCR näher betrachtet.

#### 5.6.1.1 Quantifizierung des Transkriptes

Zunächst wurden Oligonukleotide mit der Internetresource Primer3 aus humaner Sequenz zur Amplifikation eines Produktes mit einer Größe zwischen 100 und 200 bp ermittelt. Die erwartete Größe des PCR-Produktes (4.10.5.1) betrug 158 bp. Das Produkt war im Vergleich zum Größenstandard auch nach Etablierung der Reaktion im Agarosegel auf der erwarteten Höhe sichtbar (Abb. 5.29). Durch Klonierung und Sequenzierung (4.10.7) konnte mittels eines Sequenzabgleiches sowie einer Datenbankrecherche mit dem BLAST-Algorithmus die Identität des PCR-Produktes als Teil des Transkriptes des hypothetischen Proteins FLJ20625 bestätigt werden.

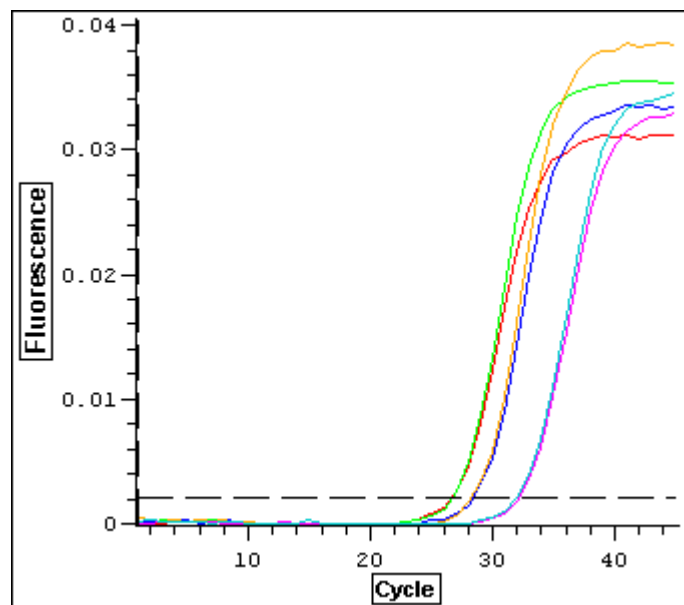


**Abb. 5.29:** Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel mit spezifischem Produkt für das hypothetische Protein FLJ20625 (hyp). Es wurde kein unspezifisches Produkt in der Wasserkontrolle beobachtet (H<sub>2</sub>O).

Bei einer PCR besteht während der exponentiellen Wachstumsphase über die Reaktionszyklen hinweg eine stark reproduzierbare Beziehung zwischen der Menge der Matrize am Anfang der Reaktion und der Anzahl der Zyklen, die benötigt werden, bis es zu einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenz kommt.

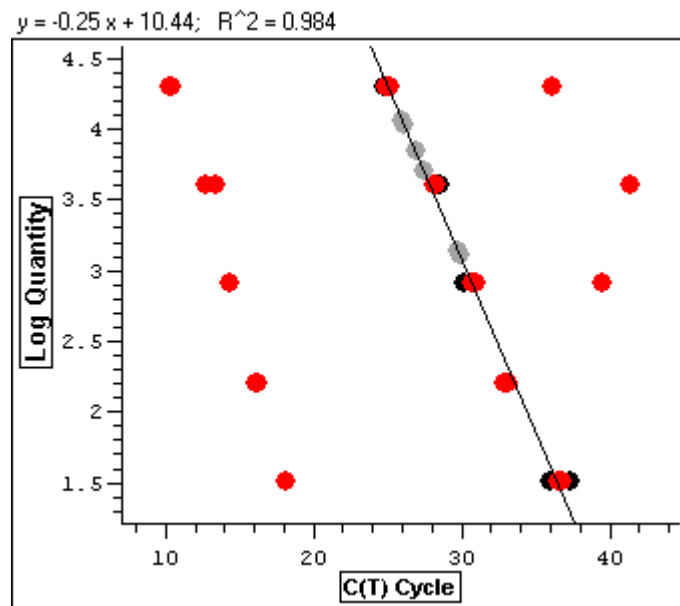
Im Anschluss an ein *Real time*-Experiment muss zunächst die sog.  $c(t)$ -Linie in einem Graph, bei dem die Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl aufgetragen ist, ermittelt werden. Diese wird auf der Höhe positioniert, auf der das Signal sich über das Untergrundrauschen erhebt. Durch die gleichzeitige Verwendung von Standards zur Quantifizierung wird mittels der jeweiligen Werte der  $c(t)$ -Linie die Anfangsmenge der Matrize ermittelt. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Über die *Real time*-PCR (4.10.5.3) wurde das Transkript des hypothetischen Proteins FLJ20625 quantifiziert. Hierbei ist in Abb. 5.30 die Zunahme der Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl bei den Reaktionen mit den Matrizen von fBMEC, BMECP0 und BMECP2 gezeigt.



**Abb. 5.30:** Fluoreszenz gegen Zyklenzahl von fBMEC (rot und grün), BMECP0 (gelb und blau) und BMECP2 (cyan und violett) mit Primern für das hypothetische Protein FLJ20625. Die  $c(t)$ -Linie ist gestrichelt eingefügt.

Nach der halblogarithmischen Auftragung der Menge des Standards (schwarze Punkte) gegen die Zyklenzahl wurde eine Standardgerade erhalten (Abb. 5.31). Durch Einfügen der Messwerte der Proben (graue Punkte) ist die Mengen der Matrizen des hypothetischen Protein FLJ20625 in fBMEC, BMEC\_P0 und BMEC\_P2 ermittelt worden.



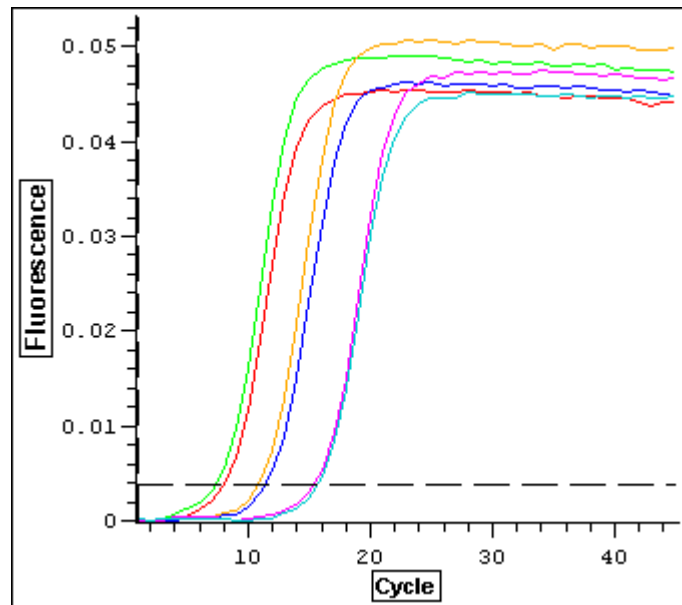
**Abb. 5.31:** Standardreihe für das hypothetische Protein (schwarze Punkte mit Ausgleichsgerade) mit Werten der zu bestimmenden Proben (graue Punkte); Rot sind die Messwerte aus Parallelexperimenten markiert.

Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Tabelle 5.8 zusammengefasst. Da die Quantifizierung nicht absolut bestimmt werden kann, ist ein Standard nötig, um die Menge relativ zur 18SrRNA bestimmen. Als Referenz diente die Menge an 18SrRNA. Hierzu mußte die Menge der 18SrRNA quantifiziert werden.

### 18SrRNA

Die PCR-Bedingungen und Primer für die 18SrRNA stammen von C. Bangsow und mussten somit nicht mehr etabliert werden. Die Identität des PCR-Produktes ist ebenfalls überprüft worden.

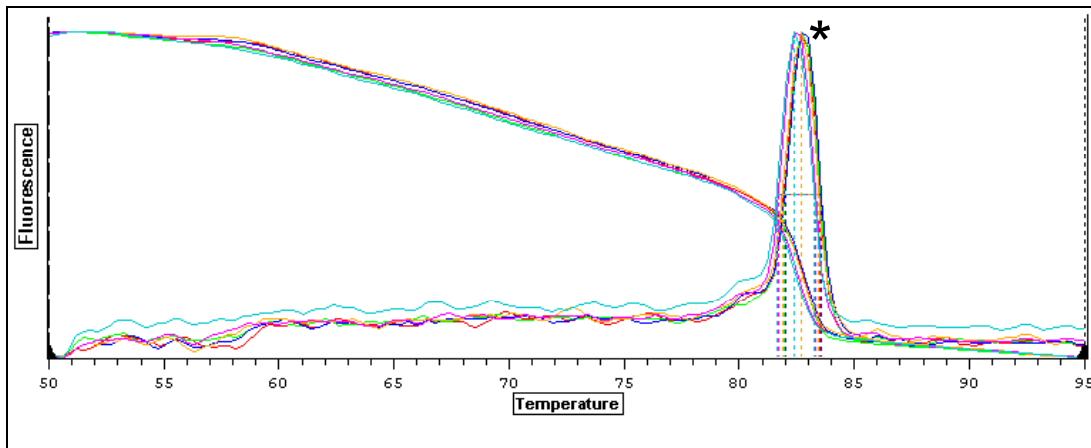
In Abb. 5.32 ist das exponentielle Wachstum des PCR-Produktes von 18SrRNA über die Zyklenzahl durch die Fluoreszenz (4.10.5.3) dargestellt. Untersucht wurde dies mit fBMEC, BMECP0 und BMECP2. Als gestrichelte Linie ist der c(t)-Schwellenwert angezeigt.



*Abb. 5.32: Zunahme der Fluoreszenz gegenüber der Zyklenzahl von fBMEC, BMECP0 und BMECP2 mit Primern für die 18SrRNA. Die c(t)-Linie ist gestrichelt eingezeichnet.*

Da für das Produkt der 18SrRNA kein Agarosegel abgebildet wurde, ist im folgenden die Schmelzkurve der PCR-Produkte aus den parallel durchgeführten Reaktionen abgebildet (Abb 5.33).

Das Prinzip der Schmelzkurve beruht darauf, dass die Fluoreszenz angelagerter Farbstoffe von einzelsträngiger DNA geringer ist, als die bei doppelsträngiger. Das Aufbrechen des Doppelstrangs resultiert demnach in einem Verlust der Fluoreszenz. Die Schmelztemperatur ist im Wendepunkt der Steigung bei Auftragung der Fluoreszenz gegen die Temperatur zu entnehmen. Aus der ersten Ableitung der Funktion resultiert ein einzelner Peak. Bei mehreren Produkten können auch unterschiedliche Schmelztemperaturen gemessen werden, was zu mehreren Peaks führt. Diese wurden aber bei keinem der durchgeführten Experimente erhalten.



*Abb. 5.33: Schmelzkurve des PCR-Produktes aus 18SrRNA durch Auftragung der Fluoreszenz gegen die Temperatur und die erste Ableitung der Funktion (\*).*

Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Tabelle 5.8 zusammengefasst und dienen als Referenz für die übrigen Transkripte.

### 5.6.2 Caveolin-1

Im LC-MS-Experiment (4.8.4) wurde Caveolin in P0 bzw. P2 mit 3 Peptiden und einem Score von 44 bzw. mit 5 Peptiden und einem Score von 95 identifiziert. Die theoretische Masse stimmt hierbei mit der Laufhöhe im Gel überein.

Der Western Blot mit Caveolin-1-Färbung ist in Abb. 5.17 abgebildet. Hierbei wurde von beiden Passagen (P0 und P2) sowohl Gesamtprotein, als auch *Lipid raft*-Fraktion gefärbt. Es zeigte sich, dass in P0 mehr Caveolin als in Passage 2 detektierbar wurde.

#### 5.6.2.2 Immunhistochemie

Die Färbung von fixierten Zellen (4.2.6) wurde mit Cy2-markierten Zweitantikörpern durchgeführt (4.9). Die Belichtungszeit war bei der Aufnahme der Färbung beider Passagen gleich und betrug jeweils 2 sec. Dabei ist die Färbeintensität in Passage 0 (Abb. 5.34) deutlich höher als in Passage 2 (Abb. 5.35).



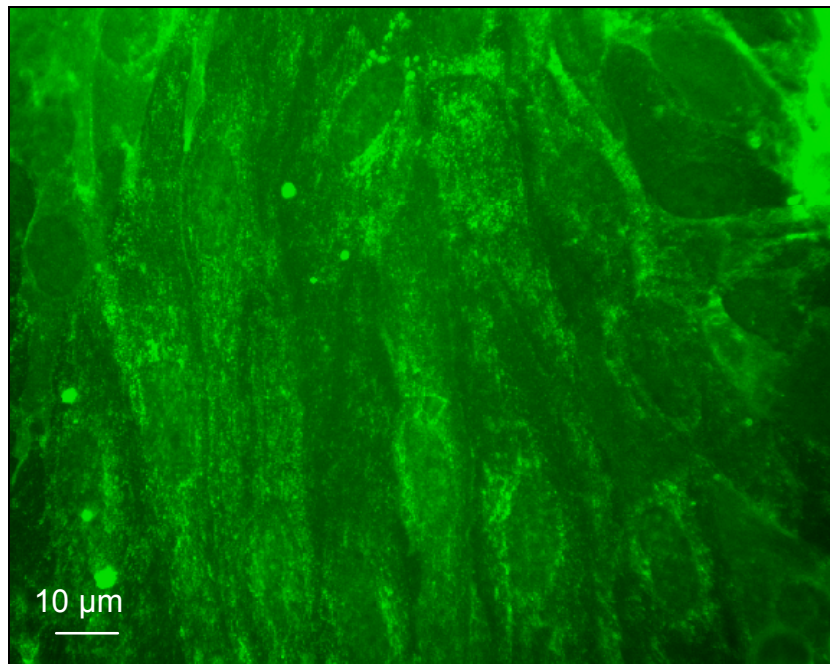


Abb. 5.34: Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-Caveolin von kultivierten Hirnkapillarendothelzellen der Passage 0; Belichtungszeit 2 sec.

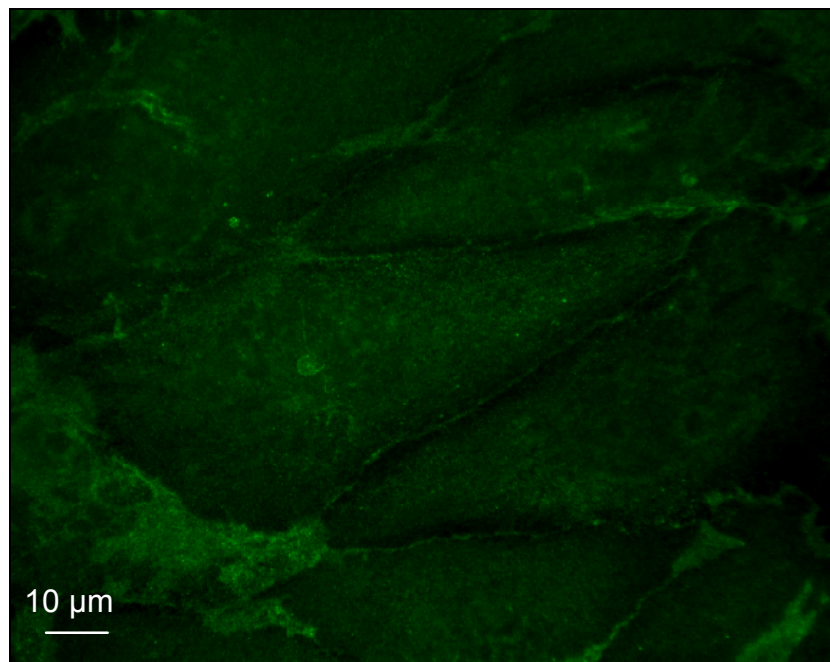
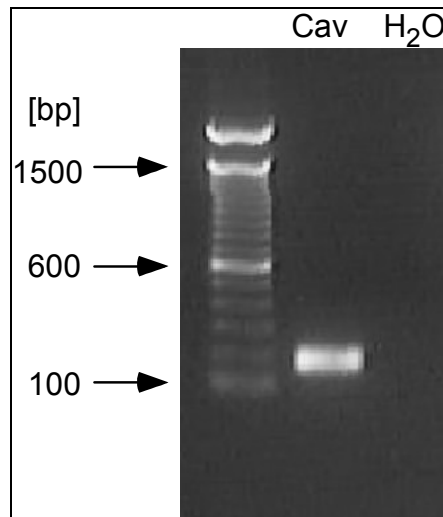


Abb. 5.35: Hirnkapillarendothelzellen der Passage 2 mit Anti-Caveolin und mit Cy2-markierten Zweitantikörpern gefärbt; Belichtungszeit 2 sec.

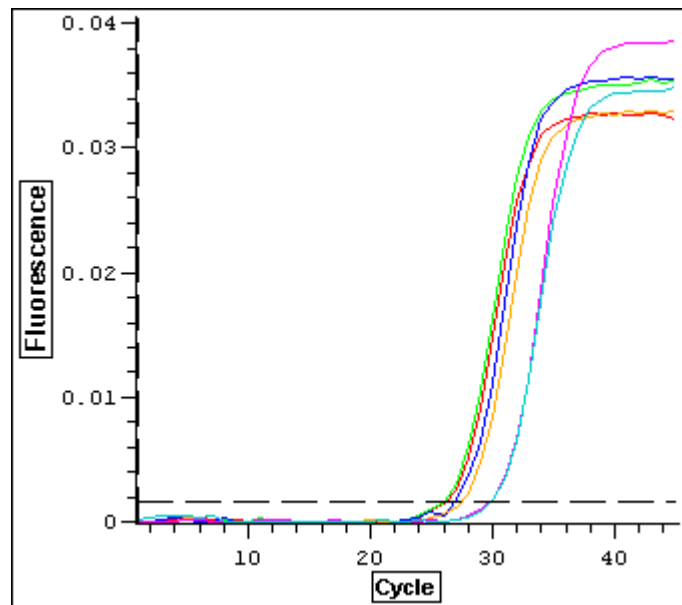
### 5.6.2.3 Real time PCR

Nachdem mit Primer3-Software Oligonukleotide für Caveolin aus der bovinen und humanen Sequenz abgeleitet wurden, mussten zunächst die Reaktionsbedingungen für die PCR-Reaktion etabliert werden. Ziel war es, mit dem Primerpaar zu einem einzelnen spezifischen Produkt zu gelangen (4.10.5.1). Die erwartete Größe des PCR-Produktes sollte dabei 188 bp betragen. Die Produktgröße ist nach dem Vergleich mit dem Größenmarker erreicht worden (Abb. 5.36), wohingegen die Wasserkontrolle (Negativ-Kontrolle) keine Bande aufzeigt. Im Anschluss daran folgte nach Klonierung in den pGEM®-Teasy-Vektor die Sequenzierung des PCR-Produktes. Die Sequenz wurde mit der in der Datenbank annotierten Sequenz mittels SeqMan, oder einer Datenbankrecherche mit dem BLAST-Algorithmus abgeglichen. Dadurch wurde die Identität des PCR-Produktes als Teil des Caveolin-Transkriptes verifiziert.



**Abb. 5.36:** Ethidiumbromid-gefärbte Bande im 1%(w/v) Agarosegel. PCR-Produkt mit Primern für Caveolin (cav) und Wasserkontrolle ohne eingesetzte Matrize (H<sub>2</sub>O).

Nachdem die Herkunft des PCR-Produktes bestätigt war, folgte die Quantifizierung des Transkriptes in frisch isolierten BMECs (fBMEC) und in kultivierten Hirnkapillarendothelzellen der Passagen 0 und 2 mittels *Real time*-PCR (4.10.5.3). In Abb. 5.37 ist die Fluoreszenz der Proben gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Aus dem Schnittpunkt der c(t)-Linie mit den Kurven resultieren die entsprechenden Achsenabschnitte.



**Abb. 5.37:** Zunahme der Fluoreszenz mit der Zyklenzahl bei einer PCR mit Primern für Caveolin von fBMEC (rot und grün), BMECP0 (blau und gelb) und BMECP2 (cyan und violett). Gestrichelt ist die sog.  $c(t)$ -Linie dargestellt.

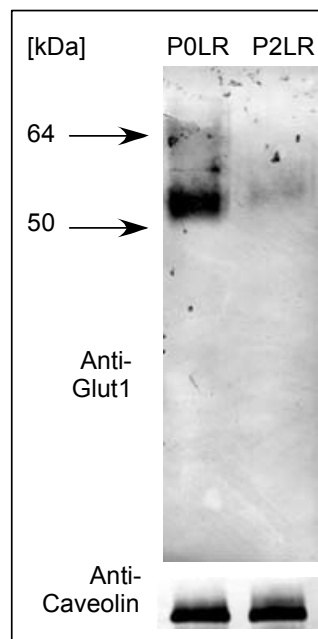
Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Tabelle 5.8 zusammengefasst.

### 5.6.3 GLUT1

Der Glucose-Transporter wurde mittels LC-MS in beiden Fraktionen identifiziert. In beiden Passagen wurde das Protein mit jeweils den 2 gleichen Peptiden und einem Score von 43 identifiziert. Die Laufhöhe der isolierten Banden im Gel stimmte dabei mit der theoretischen Masse überein. Mittels eines Antikörpers wurden Western Blot und immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt.

#### 5.6.3.1 Western Blot

Um nicht nur qualitative Aussagen über die Unterschiede zwischen den LR-Fractionen von P0 und P2 machen zu können, wurden ein Western Blot (4.7.2) und eine Immunfärbung (4.7.3) mit Antikörpern gegen den Glukosetransporter GLUT1 durchgeführt.



**Abb. 5.38:** Immunfärbung von P0LR und P2LR gegen GLUT1 (oben) und Caveolin (unten); 2,5 µg Gesamtproteinmenge je Spur.

Bei gleicher Auftragsmenge von P0LR und P2LR kann ein erheblicher Unterschied in der Färbeintensität beobachtet werden (Abb. 5.38, oben). Im Vergleich dazu ist die Färbung gegen Caveolin identisch (Abb. 5.38, unten). Bei einem Western Blot mit Gesamtprotein ist die Intensität der Banden nach Färbung mit Anti-GLUT1-Antikörpern analog zu Abb. 38 (o. Abb.).

#### **5.6.3.2 Immunhistochemische Färbung der Zellen mit Anti-GLUT1**

Bei der Färbung (4.9) der fixierten Zellen der Passagen P0 (Abb. 5.39) und P2 (Abb. 5.40) ist ein mit Cy3- markierter Zweitantikörper zur Verwendung gekommen. Es zeigte sich bei gleicher Belichtungszeit (0,3 sec) eine höhere Färbeintensität in Passage 0.

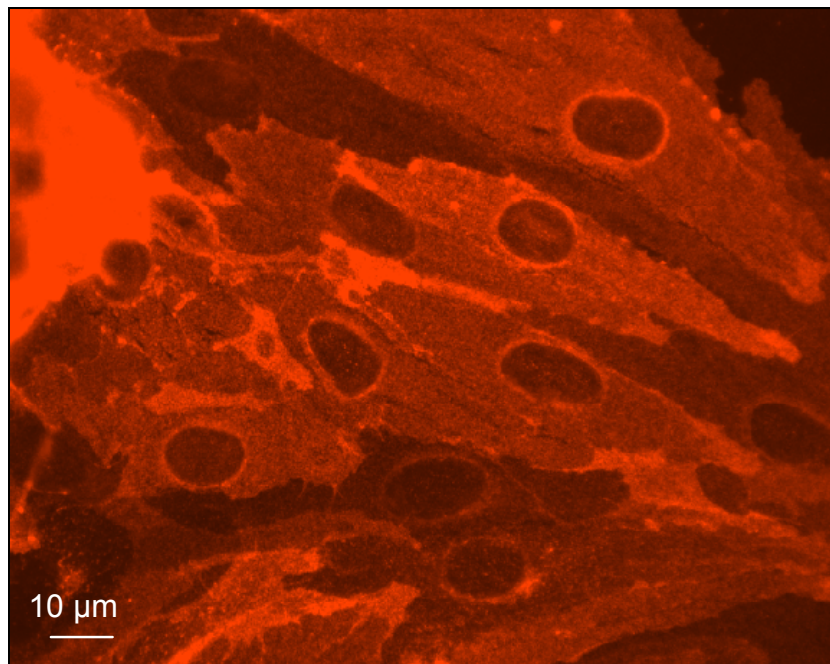


Abb. 5.39: Anti-GLUT1-Immunfärbung der Passage 0 von kultivierten Hirnkapillarendothelzellen; Belichtungszeit 0,3 sec.

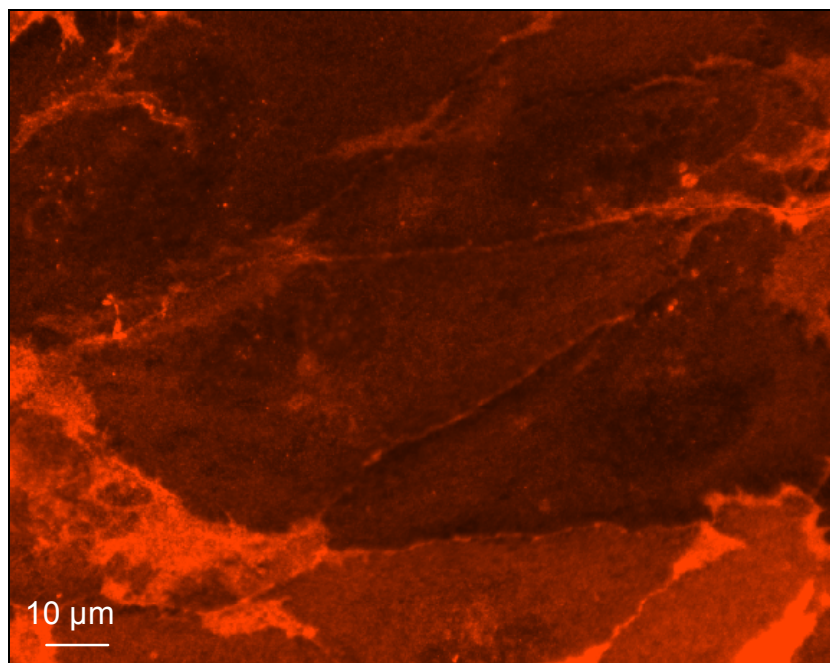
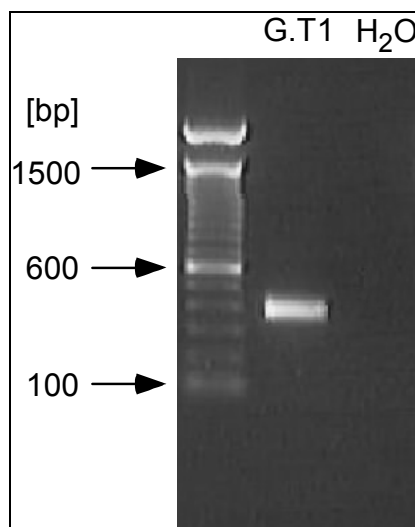


Abb. 5.40: Aufnahme der Immunfluoreszenz nach Färbung von Zellen aus Passage 2 kultivierter Hirnkapillarendothelzellen mit Anti-GLUT1-Antikörpern; Belichtungszeit 0,3 sec.

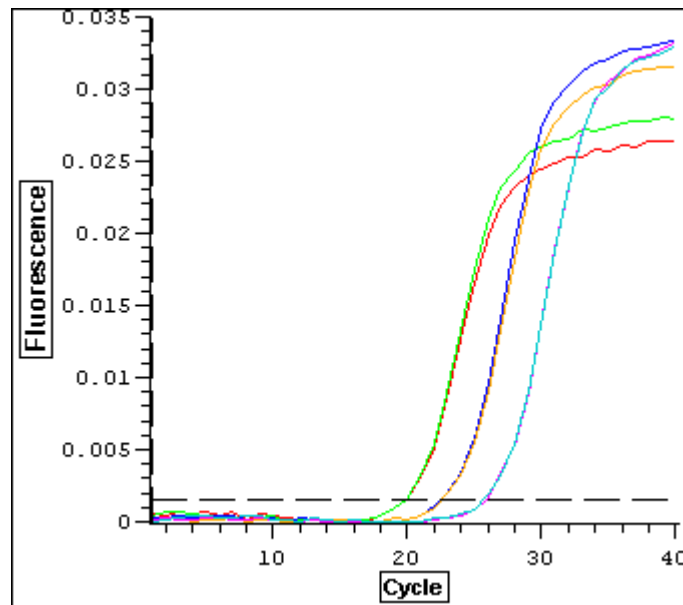
### 5.6.3.3 Quantifizierung des Transkriptes

Nach Bestimmung der Primer aus humaner und Schweine-Sequenz über Primer3-Software, wurden die Bedingungen der PCR-Reaktion für den Glukosetransporter GLUT1 etabliert (4.10.5.1). Die erwartete Produktgröße betrug 375 bp. In Abb. 5.41 ist in der Spur G.T1 ein Produkt zu sehen, das dieser Größe entspricht. Durch Klonierung, Sequenzierung, sowie nachfolgendem Sequenzabgleich (4.10.7) wurde das PCR-Produkt als ein von GLUT1 stammendes Fragment bestätigt.



**Abb. 5.41:** Agarosegel mit spezifischem Produkt bei 375 bp für GLUT1 (G.T1). Es wurde kein Produkt erhalten, wenn keine Matrize eingesetzt wurde (H<sub>2</sub>O).

In der nachfolgender *Real time*-PCR (4.10.5.3) wurde die Menge des GLUT1-Transkriptes bestimmt. In Abb. 5.42 ist die Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl mit c(t)-Linie abgebildet. Untersucht wurden fBMEC, BMECP0 und BMECP2 mit Primern für GLUT1.

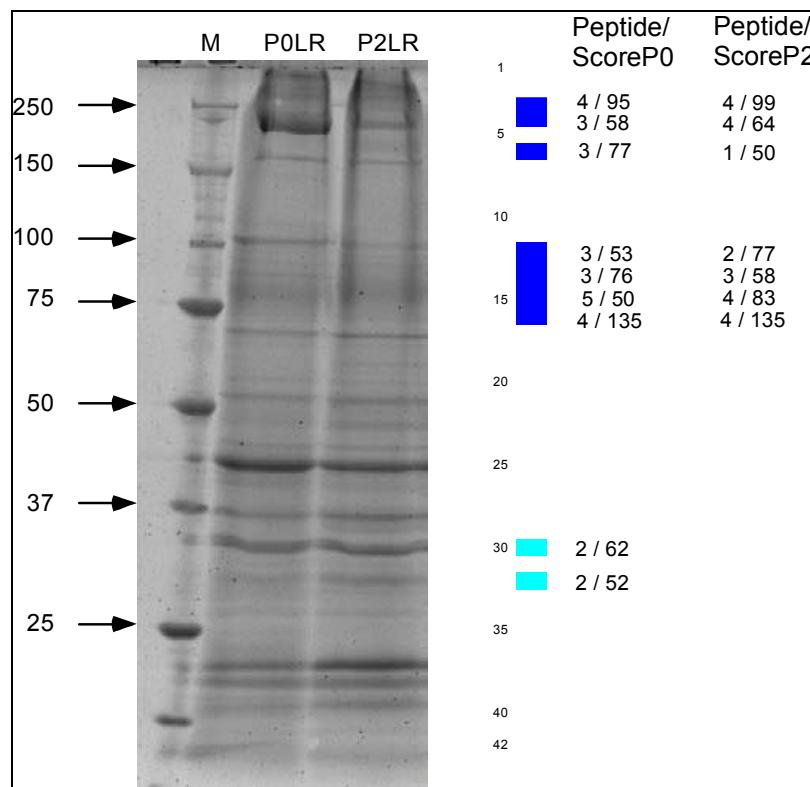


**Abb. 5.42:** Sigmoidale Zunahme der Fluoreszenz mit der Zyklenzahl bei einer PCR von fbMEC (rot und grün), BMECP0 (gelb und blau) und BMECP2 (cyan und violett) mit Primern für GLUT1. Die  $c(t)$ -Linie ist gestrichelt dargestellt.

Wie in Abb. 5.31 gezeigt, wurde über eine Standardkurve die Menge der Matrize zu Beginn der Reaktion ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.8 präsentiert.

#### 5.6.4 ABCG2

Durch das LC-MS-Experiment wurde auch das ABCG2 identifiziert. Zunächst sind unterschiedliche Peptide in zahlreichen Banden gefunden worden. Das Molekulargewicht aus dem Gel stimmt dabei nicht in allen Fällen mit der theoretischen Masse überein. Daneben ist das Protein in Fraktion 30 und 32 lediglich in P0 erfasst worden (Abb. 5.43). In der nachfolgenden Abbildung ist das Auftreten der Peptide mit entsprechender Anzahl und Score pro Bande aufgezeigt. Eine Abdeckung der Sequenz des Proteins durch die jeweiligen Peptide ist im Anhang zu finden.

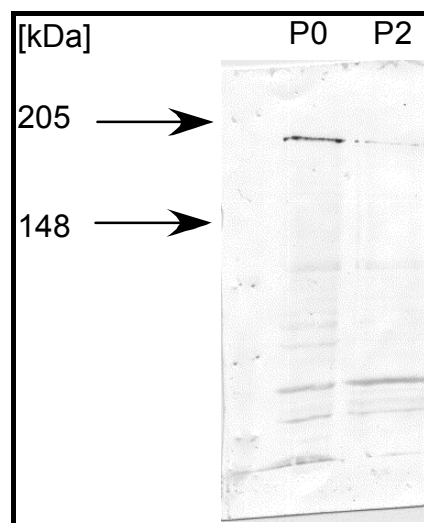


**Abb. 5.43:** SDS-Gel von P0LR und P2LR mit Banden, in denen Peptide des ABCG2-Transporters identifiziert wurden. Dunkelblau in beiden Fraktionen, Hellblau nur in P0LR.

#### 5.6.4.1 Western Blot mit Anti-humanBCRP-Antikörper

Der Western Blot mit Gesamtprotein der beiden Passagen, welcher mit Anti-humanBCRP-Antikörper gefärbt wurde, zeigte lediglich eine spezifische Bande etwa 220 kDa (Abb. 5.44). Diese Bande ist in P0 wesentlich stärker, als in P2. Die anderen Banden rühren vom Zweitantikörper her, wie durch eine Kontrolle, bei der die Membran ohne Erstantikörper gefärbt wurde, gezeigt werden konnte (o. Abb).





**Abb. 5.44:** *Western Blot von Passage 0 und 2 mit jeweils 18  $\mu$ g aufgetragenem Gesamtprotein; gefärbt mit Anti-humanBCRP-Antikörper.*

Ein Western Blot von den *Lipid raft*-Fraktionen beider Passagen, gefärbt mit Anti-humanBCRP-Antikörpern, zeigte kein Signal.

#### **5.6.4.2 Immunhistochemie**

Mittels der Zellfärbung (4.9) konnte bei jeweils gleicher Belichtungszeit (1 sec) und einem Cy3-markierten Zweitantikörper kein Unterschied zwischen P0 (Abb. 5.45) und P2 (Abb. 5.46) in der Färbintensität festgestellt werden.

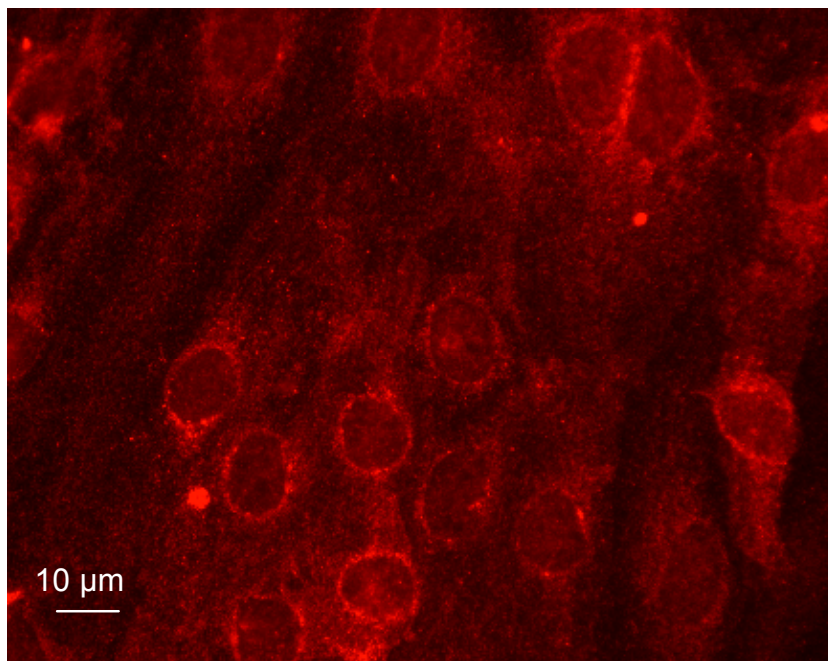


Abb. 5.45: Aufnahme der Immunfluoreszenz nach Färbung von Zellen aus Passage 0 kultivierter Hirnkapillarendothelzellen mit Anti-humanBCRP-Antikörpern; Belichtungszeit: 1 sec.

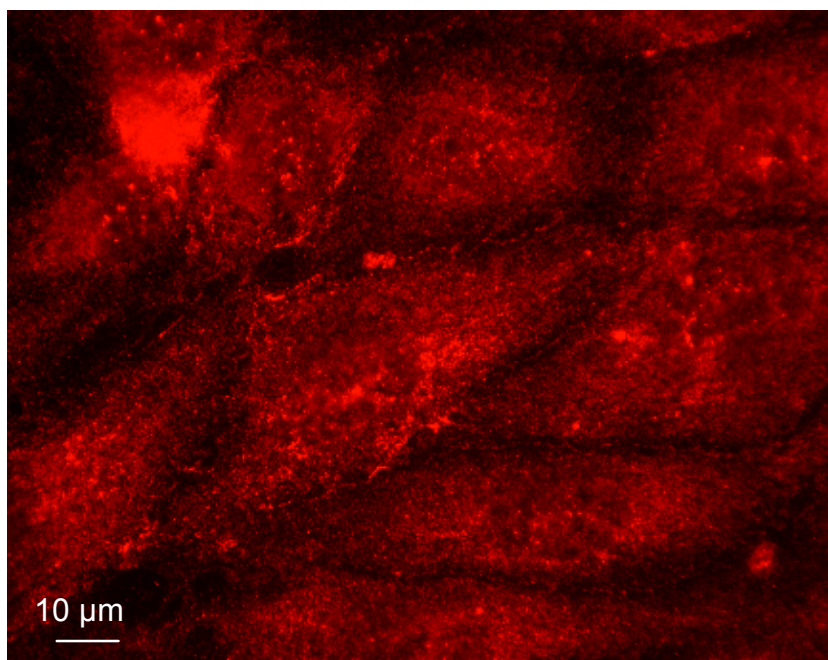
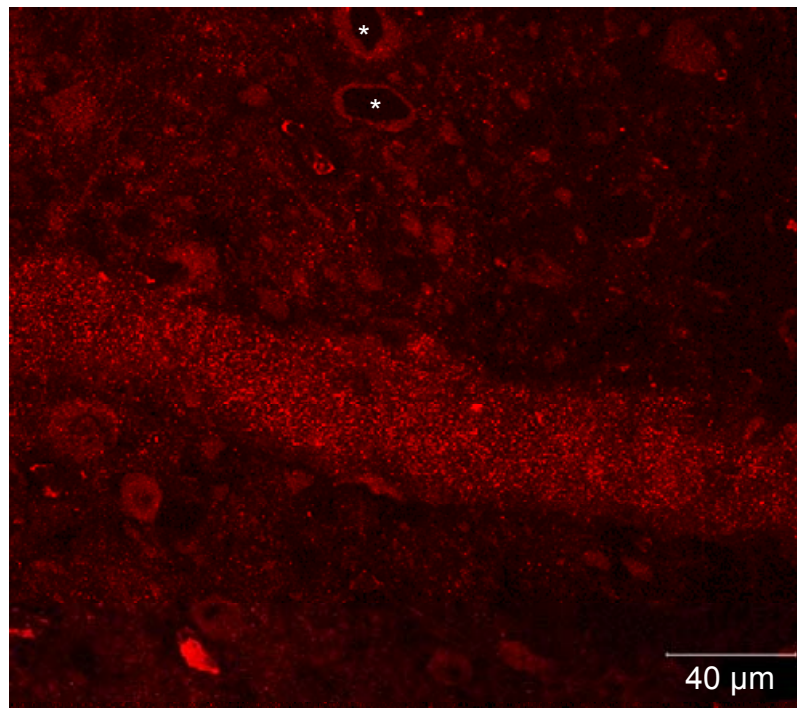


Abb. 5.46: Aufnahme der Immunfluoreszenz nach Färbung von Zellen aus Passage 2 kultivierter Hirnkapillarendothelzellen mit Anti-humanBCRP-Antikörpern; Belichtungszeit: 1 sec.

Neben der Färbung der kultivierten Zellen wurde mit Anti-humanBCRP-Antikörpern ein Gehirnschnitt gefärbt (4.9) und nach der Färbung mit einem konfokalen Mikroskop visualisiert. Deutlich ist dabei ein horizontal verlaufender, gegenüber dem Rest des Bildes stärker gefärbter Streifen in Abb. 5.47 zu erkennen. Der intensiv gefärbte Abschnitt verläuft durch die ganze Dicke des Schnittes, was durch die Auswertung der z-Ebene ermittelt wurde. Außerdem sind die kreisförmigen Löcher mit umgebender intensiver Färbung (obere Bildrand, Mitte) auffällig. Bei dem Bild handelt es sich um die „2D Maximum Projektion“ aller Ebenen.

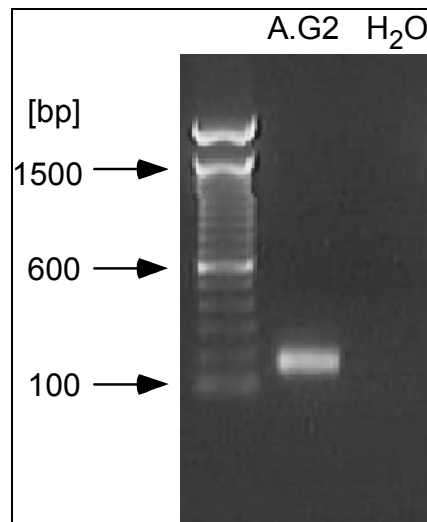


*Abb. 5.47: Fixierter Gewebeschnitt aus dem Cortex von Schweinen mit Anti-humanBCRP-Antikörper gefärbt. „2D Maximum Projektion“ einer Aufnahme mit dem konfokalen Mikroskop. Neben dem horizontal verlaufenden Band sind die hell umrandeten Löcher (mit \* markiert) am oberen Bildrand hervorzuheben.*

#### **5.6.4.3 Quantifizierung des ABCG2-Transkriptes**

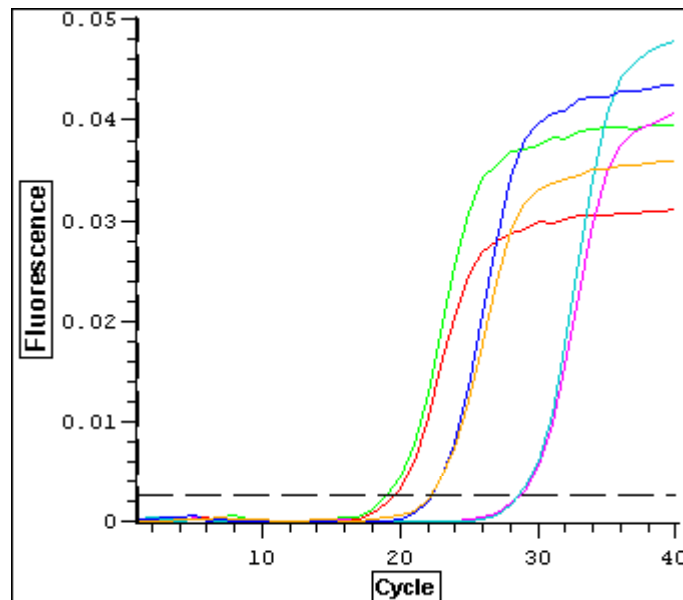
Vom ABCG2-Transkript der Schweinesequenz erfolgte zunächst die Ermittlung der Primer mit der Internetresource Primer3. Die erwartete Größe des Produktes sollte 166 bp betragen. Bei Etablierung der PCR-Bedingungen (4.10.5.1) befand sich das PCR-

Produkt im Agarose-Gel (Abb. 5.48) im Vergleich zum Größenmarker etwa auf der gewünschten Höhe.



**Abb. 5.48:** Agarosegel mit Ethidiumbromid gefärbter DNA. PCR-Produkt mit Primern für ABCG2 (A.G2) und kein Produkt, wenn die Matrize nicht vorhanden ist (H<sub>2</sub>O).

Nach Klonierung in einen Vektor konnte durch nachfolgende Sequenzierung und Sequenzabgleich die Identität des PCR-Produktes als Teil des Transkriptes von ABCG2 bestätigt werden.



**Abb. 5.49:** Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl von fBMEC (rot und grün), BMECP0 (gelb und blau) und BMECP2 (cyan und violett) bei einer PCR mit Primern für ABCG2. Gestrichelt ist die c(t)-Linie markiert.

Die Quantifizierung des Transkriptes in fBMEC, BMECP0 und BMEC2 erfolgte mittels *Real time*-PCR (4.10.5.3). In Abb. 5.49 ist die Zunahme der Fluoreszenz mit der Zyklenzahl der einzelnen Proben dargestellt. Daneben ist die c(t)-Linie, aus der die Messwerte ermittelt wurden, gestrichelt eingezeichnet.

Mittels einer Standardgerade wie in Abb. 5.32, wurde die Menge des ABCG2-Transkriptes bestimmt und in Tab. 5.8 eingetragen.

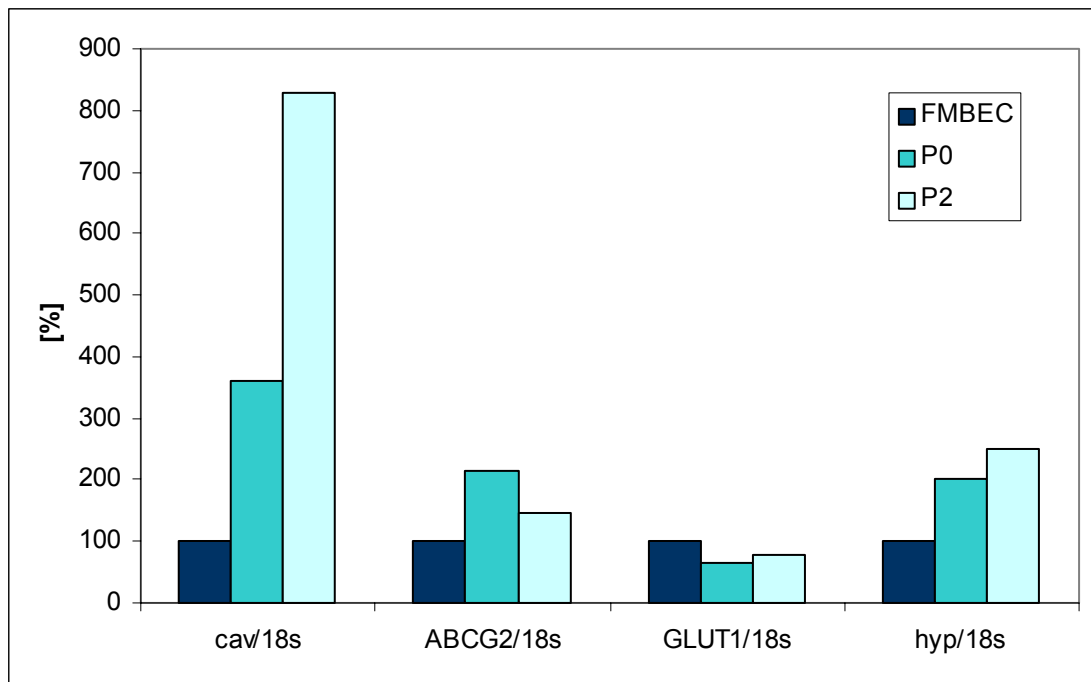
## 5.7 Zusammengefasste Ergebnisse der Quantifizierung

Mittels der jeweiligen Standardkurven für die jeweiligen Produkte 5.6.1 – 5.6.4 ergab sich schließlich die Quantifizierung der entsprechenden Transkripte. In Tabelle 5.8 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Hierbei ist noch mal darauf hinzuweisen, dass die Quantifizierung nicht absolut ist. Die angegebene Menge in pg bezieht sich auf die ursprünglich eingesetzte Menge RNA in der cDNA-Synthese (s. 4.10.7.3). Die Mengen dienen lediglich dazu, das Verhältnis zur 18SrRNA zu bestimmen.

**Tab. 5.8:** Menge der unterschiedlichen Transkripte in der Doppelbestimmung aus unterschiedlichen Passagen.

	18SrRNA	Caveolin	ABCG2	GLUT1	FLJ20625
	[pg]	[pg]	[pg]	[pg]	[pg]
fBMEC	8911	10572	9726	9825	10779
	13001	11329	9447	10413	10552
BMECP0	1454	7059	3386	1031	3956
	1987	5091	3262	1048	4348
BMECP2	168	1300	179	114	452
	145	1350	217	108	491

In Abb. 5.50 sind die Verhältnisse der einzelnen Transkripte gegenüber der 18SrRNA in Abhängigkeit zu ihrer jeweiligen Fraktion aufgezeigt. Hierbei wurde das Verhältnis zur 18SrRNA in fBMEC als 100% definiert.



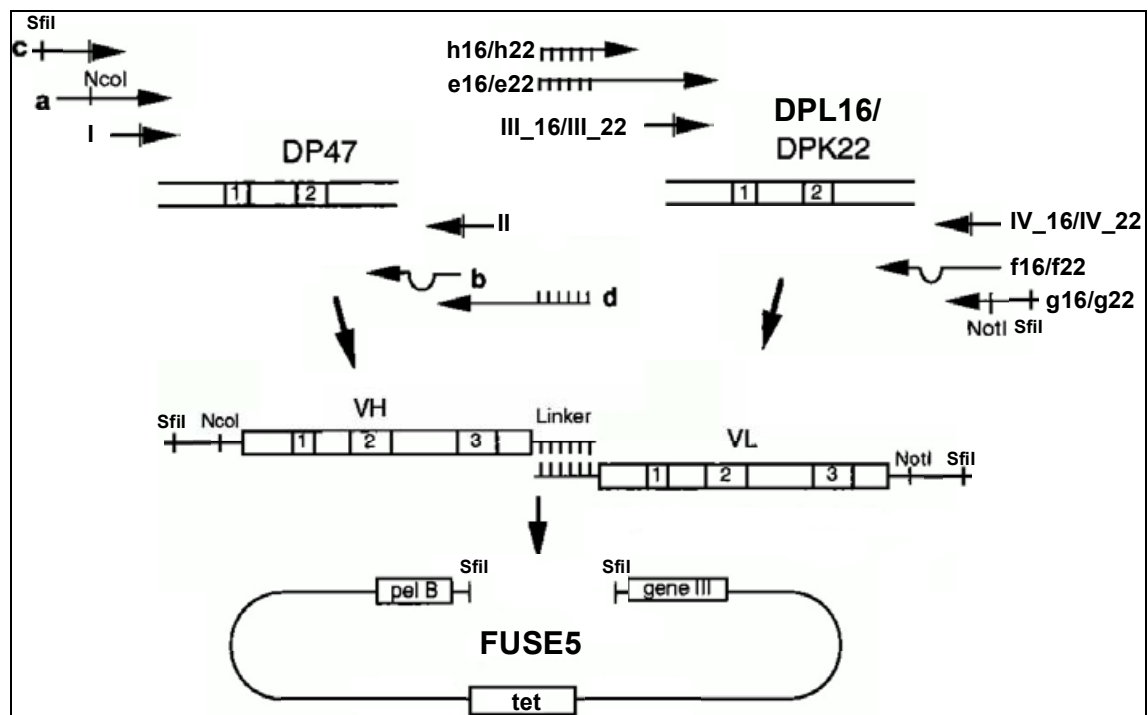
**Abb. 5.50:** Quotient der Menge der einzelnen Transkripte zur 18SrRNA in Abhängigkeit zum Kultivierungsstatus (fBMEC, BMECP0 und fBMECP2).

Wie in Abb. 5.50 zu erkennen ist, nimmt das Verhältnis von Caveolin (cav) und dem hypothetischen Protein FLJ20625 (hyp) mit zunehmender Kultivierungsdauer zu. Besonders drastisch ist dies bei Caveolin, bei dem sich der Quotient von fBMEC zu BMECP0 zunächst vervierfacht und in BMECP2 insgesamt achtmal höher exprimiert ist, als in fBMEC. Bei ABCG2 steigt die Expression des Transkriptes zunächst auf den doppelten Wert von fBMEC zu BMECP0 hin an, um in BMECP2 wieder um rund 50 % zu sinken. Bei GLUT1 liegt die Expressionsrate in beiden Passagen bei rund 70% des Ausgangswertes (fBMEC).

## 5.8 Phagen Display

Mittels kombinatorischer Methoden wurde über entsprechende Primer und Amplifikationsschritte eine *Phage Display*-Bank etabliert (4.10.5.4). Im Rahmen dieser Arbeit wurden, modifiziert nach Pini et al. (1998), *single-chain Fv*-Antikörper als Fusionsproteine mit dem Oberflächenprotein pIII vom filamentösen Phagen fd-tet präsentiert. Als erster Schritt zum Aufbau einer künstlichen Bank an Antikörpern wurde humane DNA aus HeLa-Zellen isoliert (M.Jäger).

Anschließend erfolgte die Amplifizierung von Teilsequenzen zweier leichter (DPL16 und DPK22) und einer schweren Kette (DP 47). Dabei wurden an den CDR 3 zufällige Basen über Oligonukleotide eingeführt und die beiden Ketten schließlich fusioniert und in den Vektor FUSE5 [Scott und Smith, 1990] durch Ligation eingefügt. Das folgende Schema veranschaulicht die aufeinanderfolgenden Schritte zum Aufbau der Bank.

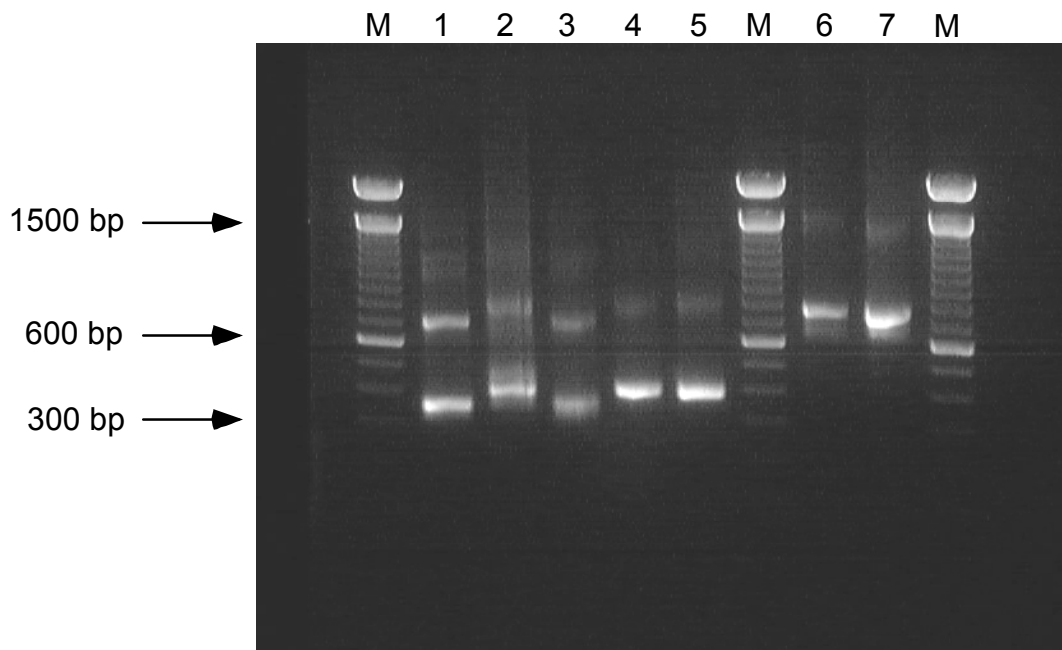


**Abb. 5.51:** Schema für den Aufbau der Phage Display-Bank. Die horizontalen Pfeile, parallel zu den Genabschnitten DP47 und DPL16/DPK22, geben die für die PCR verwendeten Oligonukleotide an. Die Abfolge der Amplifikationen, bezogen auf den DNA-Abschnitt, erfolgte von innen nach außen. Die Wölbungen bei den Primern b und f16/f22 geben das Einfügen der variablen Sequenzen an den CDRs an; letztere sind mit den Ziffern in den DNA-Abschnitten bezeichnet. Nach der Fusionierung und der Restriktion wird der Abschnitt durch Ligation in den Vektor FUSE5 eingefügt.

### 5.8.1 Aufbau der Bank

Ausgehend von humaner genomischer DNA wurden nach Abb. 5.51 zunächst mit den Primern I/II (DP47), III\_16/IV16 (DPL16) und III\_22/IV\_22 (DPK22) die 3 Ketten amplifiziert (4.10.5.4). Die spezifischen PCR-Produkte wurden aus dem Gel eluiert (4.10.3.3) und nach der Restriktion mit *EcoRI* und *BamHI* (4.10.2.2) in den pBluescript durch Ligation (4.10.2.3) eingefügt. Nach der Transformation in TG1 (4.10.2.4) wurden am nächsten Tag von den drei Ansätzen jeweils 16 Klone isoliert und eine Über-Nacht-Kultur (4.10.1.1) angelegt, woraus am nächsten Tag die Plasmide isoliert wurden (4.10.3.1). Diese wurden anschließend mit den Oligonukleotiden M13/M13rev (4.10.7) sequenziert. Die Sequenzen wurden mit den Sequenzen von DP47, DPL22 und DPK22 aus Datenbanken verglichen und die DNA der jeweils übereinstimmenden Klone in den nachfolgenden Schritten verwendet

Es wurden 3 Klone nach der Transformation mit korrekter Sequenz ermittelt und in die folgenden Amplifikationen eingesetzt (4.11.1.2). In Abbildung 5.52 ist das mit Ethidiumbromid gefärbte Agarosegel der Amplifikationsschritte II, III und der Fusion (4.11.1.3) dargestellt.



**Abb. 5.52** Agarosegel mit Ethidiumbromid gefärbt. M: Marker; 1: Primer a/b; 2: Primer c/d; 3: Primer e22/f22; 4: Primer g22/h22; 5: Primer g16/h16; 6: Fusion 22; 7: Fusion 16.

In der Abbildung 5.52 ist zu erkennen, dass die PCR-Produkte jeweils keine homogene Größe aufweisen. Die gewünschte Produktgröße der Amplifikationen II und III (Spur



1-5) zeigten neben der gewünschten Bande bei etwa 300-400 bp ein Produkt bei etwa der doppelten Größe und teilweise ein „Schmier“ in der jeweiligen Spur. Daher wurden die PCR-Produkte jeweils aus dem Gel eluiert (4.10.3.3).

Die Produkte der Fusion (Abb. 5.51, Spur 6 und 7) haben ebenfalls die gewünschten Banden bei etwa 720 bp, doch treten auch hier die gleichen Nebenprodukte auf.

Die erhaltenen Produkte wurden gereinigt (4.10.6), anschließend mit dem Restriktionsenzym *Sfi*I hydrolysiert (4.10.2.2) und eine Gelelution durchgeführt (4.10.3.3).

Durch die Spezifität der Schnittstellen sowohl im Vektor FUSE 5 als auch der Antikörperfragmente kommt es zu einem gerichteten Einbau der Fragmente in den Vektor nach der Ligation (4.10.2.3). Nach einer Phenolextraktion der Ligationsprodukte wurden umgehend frisch präparierte elektrokompente DH5 $\alpha$ -Bakterien (4.10.2.1) mit der gereinigten DNA durch Elektroporation transformiert (4.10.2.4).

Die Bakteriensuspensionen wurden auf YT-TET-Platten (20cm x 20cm) gleichmäßig ausplattiert und die resultierenden Klone nach Inkubation für 16-22 h bei 37°C durch vorsichtiges Abschaben isoliert. Die Bakterien wurden in YT Medium mit 15% (v/v) Glycerin resuspendiert und bei –80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Anzahl der Klone der FUSE-*Phage* Display-Bank betrug  $4 \cdot 10^7$ , wobei 70 % der Bakterien-Kolonien ein PCR-Produkt mit den Primern FuseseqA/B aufwiesen, welche wiederum einen korrekten Leserahmen besaßen. Dazu wurden insgesamt 40 Klone untersucht (4.10.5.1).

## 5.8.2 Selektion der Phagen und Analyse

Die Selektion mit den präparierten Phagenpartikeln (4.12.2) der Bank wurde wie beschrieben (4.12.3) durchgeführt. Als Antigen wurde hierzu die LR-Fraktion aus P0 verwendet. Dabei wurden folgende Phagentiter nach den einzelnen Selektionsrunden erhalten.

**Tab. 5.9:** Phagentiter nach erster und zweiter Selektion gegen Lipid rafts und jeweiliger Kontrolle bei sequentieller Elution mit Triethylamin und nachfolgendem Trypsin.

	<i>Lipid rafts</i>	Kontrolle
<b>Anzahl Phagen</b>		
<b>1. Selektion (Triethylamin)</b>	$1,1 \cdot 10^5$	$8,7 \cdot 10^4$
<b>Anzahl Phagen</b>		
<b>1. Selektion (Trypsin)</b>	$6,1 \cdot 10^4$	$5,6 \cdot 10^4$
<b>Anzahl Phagen</b>		
<b>2. Selektion (Triethylamin)</b>	$1,5 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^3$
<b>Anzahl Phagen</b>		
<b>2. Selektion (Trypsin)</b>	$3,6 \cdot 10^4$	$6,9 \cdot 10^2$

Von den selektierten Phagen wurden wie beschrieben 95 Klone zufällig ausgewählt und wie unter 4.12.5 beschrieben mittels eines ELISAs analysiert.

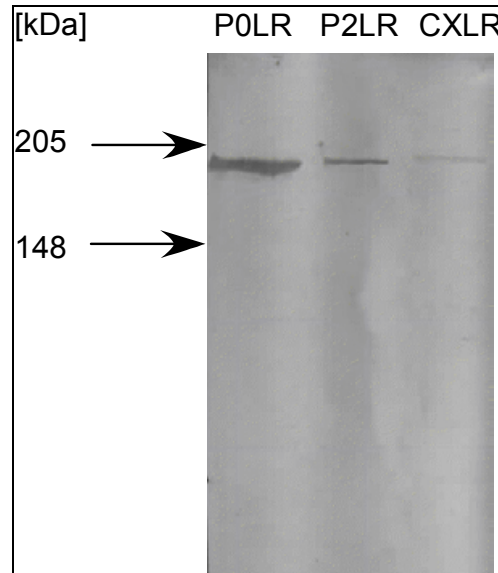
**Tab. 5.10:** Absorption bei 405 nm der mit 95 Phagenklone und Anti-M13-Meerrettichperoxidase inkubierten BMEC\_P0 (in Mikrotiterplatte) und des Nullwertes (schwarz, H12) im ELISA nach Entwicklung mit ABTS. dunkelgrau  $A_{405} \geq 1$ , hellgrau:  $A_{405} = 0,6 - 0,8$ ; weiss:  $A_{405} < 0,6$ .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,60	0,32	0,67	0,49	0,60	0,58	0,58	0,40	0,50	0,59	1,03	0,49
B	0,45	0,48	0,68	0,41	0,50	0,47	0,54	0,66	0,51	0,65	1,11	0,59
C	0,49	0,44	0,62	1,04	0,48	0,72	0,53	0,46	0,68	0,70	0,60	0,42
D	0,96	0,62	0,41	0,45	0,51	0,50	0,46	0,53	0,47	0,56	0,51	0,50
E	0,37	0,39	0,59	0,27	0,49	0,35	0,45	0,57	0,83	0,53	0,62	0,54
F	0,50	0,48	0,46	0,48	0,38	0,60	0,45	1,11	0,55	0,57	0,62	0,43
G	0,52	0,42	0,47	0,41	0,51	0,24	0,44	0,56	1,16	0,63	0,60	0,54
H	0,59	0,58	0,56	0,42	0,52	0,57	0,58	0,62	0,40	0,60	0,75	0,26

Der Versuch wurde nochmals wiederholt, wobei die in Tab. 5.10 dunkelgrau gefärbten Klone wiederum die höchste Absorption im ELISA aufwiesen. Daher wurden diese als Antigen-erkennende Phagen-Klone eingestuft. Durch eine Sequenzierung der in Tab. 5.10. dunkelgrau markierten Klone wurde festgestellt, dass diese Klone die gleiche Sequenz aufweisen. Die Sequenz mit den variablen Regionen der CDR3 ist im Anhang II dargestellt.

### 5.8.3 Immunfärbungen mit Phagen

Mit den unter 5.8.2 identifizierten Klonen erfolgte die Färbung eines Western Blots mit Phagen gegen P0-, P2- und Cortex- *Lipid Raft*-Fraktionen (4.12.6). Es wurden hierbei die Kulturüberstände der Klone vereinigt als Erstantikörper eingesetzt.



**Abb. 5.53:** *Western Blot mit Phagen als Erstantikörper. Es wurden die LR-Fraktion von P0, P2 und Cortex gefärbt. Es wurden jeweils 5 µg Protein aufgetragen.*

Es ist jeweils eine spezifische Bande in Abb. 5.53 in den Fraktionen zu erkennen. Zusätzlich wurden kultivierte Zellen der Passage 0 mit dem Kulturüberstand des Klons A11 (Tab. 5.10) gefärbt (4.12.6). Hierbei zeigte sich, dass der Phage nur bestimmte Areale in der Zelle färbt. In der Kontrolle, bei der Phagen aus einer Selektion gegen das Protein S064 (M.Jäger) verwendet wurde, zeigte sich keine Färbung der Zellen (Abb. 5.54).

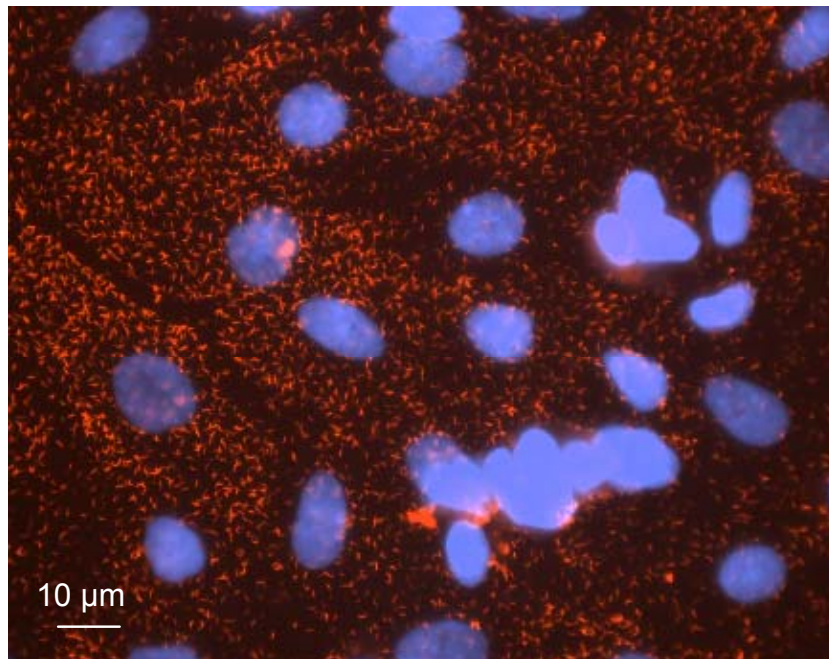


Abb. 5.54: Immunfärbung von kultivierten Hirnkapillarendothelzellen der Passage 0. Erstantikörper: Phage Klon A11; Zweitantikörper: Anti-M13 (Maus); Drittantikörper: Anti-Maus-Cy3. Belichtungszeit 0,8 sec.

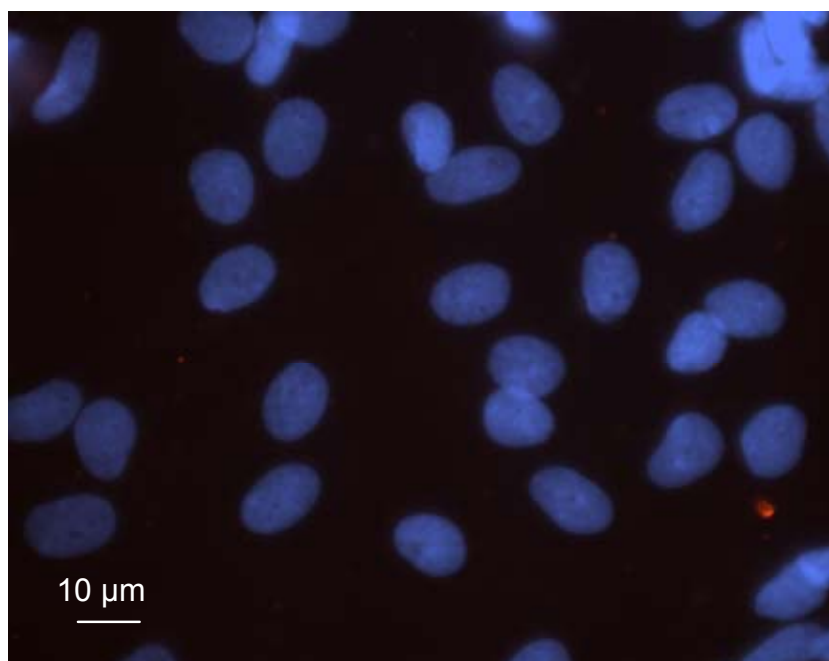


Abb. 5.55: Immunfärbung von kultivierten Hirnkapillarendothelzellen der Passage 0. Erstantikörper: Phage gegen S064 ; Zweitantikörper: Anti-M13 (Maus); Drittantikörper: Anti-Maus-Cy3. Belichtungszeit 0,8 sec.

Da der Phage erfolgreich einzelne Areale in Kultur von Hirnkapillarendothelzellen färbte und im Western Blot bei P0LR eine wesentlich höhere Färbeintensität, als in P2LR und insbesondere in LR von Cortex aufwies, war die Färbung eines Schnittes von besonderem Interesse.

Daher wurde ein Schnitt wie in 4.12.6 beschrieben mit dem Kulturüberstand des Klons A11 gefärbt und mittels des konfokalen Lasermikroskops visualisiert (Abb.5.56).

Bei der Immunfärbung ist ein horizontal verlaufender Streifen mit hoher Färbeintensität zu sehen.

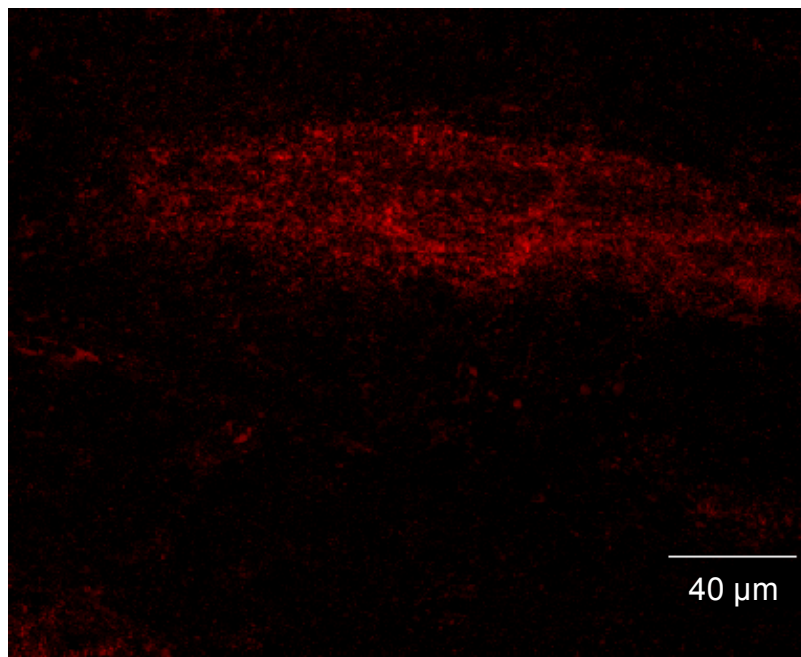


Abb. 5.56: „2D-Durchschnitts-Projektion“ einer konfokalen Aufnahme der Immunfärbung eines Cortex (Schwein). Erstantikörper: Phagen gegen LR ; Zweitantikörper: Anti-M13 (Maus); Drittantikörper: Anti-Maus-Cy3.

## 6 Diskussion

Der Arzneimitteltransport in das Gehirn ist ein komplexer physiologischer Prozess. Viele pharmakologisch wirksame Substanzen können die Blut-Hirn-Schranke (BHS) nicht passieren. Daher gewinnt die genauere Untersuchung dieses Transport-Phänomens eine immer größere Bedeutung. Für die Regulierung des Stofftransportes im ZNS sind sowohl eine passive Barriere, die aus der Vielzahl der *tight junctions* resultiert, als auch eine aktive Barriere, bestehend aus den in der Plasmamembran lokalisierten Enzyme und Transportproteine, verantwortlich. Zusätzlich werden viele Krankheitsbilder wie Gehirntumore, Multiple Sklerose und Schlaganfälle von einer Fehlfunktion der BHS begleitet.

Die Erforschung der komplexen Prozesse an der BHS *in vivo* ist aufgrund der Vielzahl an physiologischen Einflüssen außerordentlich diffizil. Daher ist es notwendig die zellulären Träger der Barriere, die Hirnkapillarendothelzellen (BMEC) in Kultur zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit sind zunächst BMEC aus dem Gehirn von frisch geschlachteten Schweinen isoliert, kultiviert und charakterisiert worden.

Die Isolation (4.1) basiert auf einem kombinierten mechanischen und enzymatischen Verfahren, das u.a. Zentrifugationsschritte mit Dextran- und Percoll-Gradienten beinhaltet. Das Verfahren setzt im Gegensatz zu rein mechanischen Verfahren [Joó, 1985] die Endothelzellen aus dem Kapillarrohr durch Kollagenase frei und vereinzelt sie weitestgehend. Kontaminierungen durch Fremdzellen, wie Perizyten und anderen Zellen werden durch die Einhaltung optimaler Kulturbedingungen für die Endothelzellen verhindert. Dies geschieht durch die Beschichtung der Kulturgefäße mit Kollagen und das Aussäen mit hoher Zelldichte. Zusätzlich wurden die Inkubationszeiten mit Trypsin während des Passagierens optimiert.

Ziel der Kultivierung war es, zwei Zustände der Hirnkapillarendothelzellen zu erhalten, bei denen die *Lipid raft*-Fraktion über eine komparative Proteomanalyse untersucht werden konnten. Hierbei waren folgende Kriterien zu berücksichtigen:

- Zustand A sollte kultivierten mikrovaskulären Endothelzellen entsprechen, welche Blut-Hirn-Schranke spezifische Eigenschaften besitzen.
- Zustand B sollte kultivierten mikrovaskulären Endothelzellen entsprechen, welche keine Blut-Hirn-Schranke spezifischen Eigenschaften mehr besitzen.
- Von beiden Zuständen sollten ausreichende Mengen (ca. 4 m<sup>2</sup> kultivierter Fläche) präparierbar sein.

Bekannt ist, dass sich die Aktivität der Enzyme  $\gamma$ -Glutamyl-transpeptidase ( $\gamma$ -GT) und Alkalische Phosphatase mit zunehmender Kulturdauer exponentiell vermindert. Es verschwinden somit entscheidende BHS-Charakteristika in BMEC-Kulturen. Dieses als Dedifferenzierung bezeichnete Phänomen wurde auch bei anderen Zelltypen wie beispielsweise artikularen Chondrozyten (Knorpelzellen) beobachtet [Schnabel et al., 2002]. Bezüglich der BMEC wird sogar die Hypothese aufgestellt, dass die Markerproteine weiterhin von den ursprünglich isolierten Zellen, jedoch nicht von proliferierten exprimiert werden. Letzteres war auch bei der Färbung mit Anti-GLUT1-Antikörpern der Passage 0 (Abb. 5.39) zu erkennen, bei der benachbarte Zellen unterschiedlich stark gefärbt waren. Diese Dedifferenzierung verstärkt sich, wenn die Zellen passagiert werden (Meyer et al. 1990). Ein ähnlicher Effekt wurde bei der Immunfärbung kultivierter Zellen mit ZO-1 Antikörpern beobachtet [Rubin et al., 1991]. Als Grundlage für eine Arbeitshypothese wurde daher das Konzept der Dedifferenzierung einzelner BHS-Marker durch fortschreitende Kultivierung auf alle BHS-spezifischen Eigenschaften übertragen.

Als die zwei Zustände A bzw. B wurden P0 bzw. P2 postuliert. Bei P0 ist es naheliegend, dass es sich bei den frisch kultivierten BMEC um Endothelzellen mit den BHS-spezifischen Eigenschaften handelt.

Dies konnte durch die Wiederholung beschriebener Experimente und durch neue Beobachtungen bestätigt werden. Von den Zellen wurde sowohl von Passage 0, als auch von Passage 2 die spezifische Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt (Abb. 5.5). Hierbei ist die Aktivität in Passage 2 viermal geringer, als in Passage 0. Auch die durchgeführte Anti-ZO-1-Färbung zeigt in Passage 2 (Abb. 5.4), im Gegensatz zu Passage 0 (Abb. 5.3), kaum noch scharfe Färbungen an den Zellrändern. Allerdings bleiben endothelspezifische Eigenschaften, wie beispielsweise durch Immunfärbungen gegen den von-Willebrand-Faktor gezeigt werden konnte (B. Pelzer), erhalten. Die Zellen lassen sich allerdings nicht unbegrenzt kultivieren, so ist über Passage 2 hinaus mit einer verstärkt auftretenden Kontaminierung durch Fremdzellen zu rechnen gewesen. Zusätzlich war die Reproduzierbarkeit der weiteren Passagen nicht gegeben und eine starke morphologische Varianz beobachtet worden (mdl. Mitteilung: B. Pelzer).

Insbesondere durch die Färbung mit dem Antikörper gegen das *tight junctions*-assoziierte ZO-1 ist der durchschnittliche Größenunterschied der beiden Passagen auffällig geworden. Dieses Phänomen ist nach jetzigem Kenntnisstand bisher noch nicht beschrieben worden und wurde daher genauer untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Flächen der Zellen und der Zellkerne in Passage 2 um den Faktor 3 größer sind, als in Passage 0 (Tab. 5.2).

Bei Untersuchungen mit einem konfokalen Mikroskop wurde beobachtet, dass die Zellen näherungsweise eine „Spiegelei-Form“ besitzen. Die Oberfläche und das Volumen wurden über zwei verschiedene Methoden aus den Daten der Mikroskopie ermittelt. Einerseits durch die manuelle Bestimmung der Höhe, und andererseits mit Hilfe einer automatischen Berechnung (5.2.4.1). Hierbei stimmten die beiden Oberflächen-Werte nahezu überein, die Werte für das Volumen wichen jedoch leicht voneinander ab (Tab. 5.3). Bei den durchgeführten Berechnungen konnte aufgrund der Form der Zellen lediglich eine Abschätzung vorgenommen werden. Das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen der Zelle bzw. des Zellkerns nimmt in der Tendenz von Passage 0 zu Passage 2 hin um den Faktor 1,1 bzw. 1,3 ab. Besonders interessant ist hierbei die Zelloberfläche selbst, denn P0 besitzt aufgrund dieser Quotienten eine größere spezifische Austauschfläche als P2. Da aber nur wenige Zellen mittels dieser Methode untersucht werden konnten, ist aus den Daten lediglich eine Tendenz und keine statistische Signifikanz abzuleiten.

Ein möglicher Grund für das Auftreten dieses Größenunterschieds ist, dass das Vergrößern und Verbreitern der Zelle mit der Dedifferenzierung der BMECs einher geht.

Ein weiterer Grund für den Größenunterschied könnte darin liegen, dass den einzelnen Zellen bedingt durch das in Tab. 4.1 angegebene Teilungsverhältnis, eine größere Fläche zur Ausbreitung zur Verfügung steht. Das bedeutet, dass der konfluente Status eher durch ein Verbreitern der Zellen, als durch Zellteilung erreicht wird. Dies könnte durch Variation der Teilungsverhältnisse, oder durch kontinuierliche Beobachtung des Wachstumsverhaltens der kultivierten Zellen geklärt werden.

In Zusammenhang mit dem Größeneffekt wurde auch der Proteingehalt der beiden Passagen ermittelt (Tab. 5.1). Dieser ist in P0 im Vergleich zu P2 mehr als 1,5 mal höher. Das ist dadurch zu erklären, dass bei Zellen der Passage 0 Zellverbände beobachtet wurden, die aus dem Zellrasen wie „Berge“ in die Höhe ragen. Diese Verbände vergrößern somit die tatsächlich kultivierte Fläche.

Hinsichtlich der am Anfang der Diskussion aufgestellten Liste an Voraussetzungen, die für eine Proteomanalyse der *Lipid raft*-Fraktion der Hirnkapillarendothelzellen zutreffen müssen, sind alle Bedingungen weitestgehend erfüllt. Sowohl von Passage 0, als auch von Passage 2 sind ausreichende Mengen an Zellkulturmaterial präparierbar. Beide Zustände unterscheiden sich grundlegend darin, dass P0 als Endothelzellen mit BHS-spezifischen Eigenschaften und P2 als Endothelzellen ohne BHS-spezifische Eigenschaften betrachtet werden können.



Die Isolierung der *Lipid raft*-Fraktionen aus verschiedenen Geweben und Zellkulturen erfolgte als *Detergent resistant membranes* (DRM). Zur Methodenetablierung wurden diese zunächst aus Cortex isoliert. Anschließend wurde die etablierte Methode auf die Isolation aus Zellkulturmaterial angewendet.

Prinzipiell wurden die DRM nach dem Protokoll von Brown und Rose (1992) unter leichten Modifikationen isoliert (4.3). Dies beinhaltete die Lyse der Zellen in Triton-X100-haltigem Puffer mit anschließender Zentrifugation im Saccharose-Gradienten, bei dem die DRM aufgrund ihres spezifischen Lipid-Gehalts und der daraus resultierenden geringeren Dichte im Gradienten aufschwammen.

Im Gegensatz zu der dort beschriebenen Methode wurden bei der Verwendung von kultivierten Zellen diese zunächst von den Kulturgefäßen abgeschabt und erst nach einem Waschschrift mit dem Triton-X100-haltigen Puffer inkubiert. Das hatte den Vorteil, dass aufgrund der Vielzahl der verwendeten Kulturflaschen das Volumen des Aufschlusses verringert wurde. Andernfalls wäre aufgrund des großen Aufschlussvolumens eine anschließende Dichtegradientenzentrifugation nicht mehr durchführbar gewesen. Beim Aufschluss wurden sowohl Dounce-Homogenisator, als auch 22G-Nadel verwendet. Letztere diente dazu, die nach der Lyse der Zellen freigesetzte DNA durch Scherkräfte zu fragmentieren und ein Aggregieren des Zellhomogenats durch die DNA zu verhindern. Beim Zentrifugationsschritt wurde auch kein linearer, sondern ein Stufengradient aus Saccharose-Lösung verwendet. Dies hatte den Vorteil, dass sich an der Grenzfläche die *Raft*-Fraktion konzentriert ansammelte, was sich als gut reproduzierbar erwies. Anhand eines Vorversuchs wurde durch eine Präparation der DRM aus Cortex-Gewebe sichergestellt, dass beim Verwenden eines linearen Gradienten keine zusätzlichen Banden auftreten (o. Abb.).

Die lange Inkubationszeit vor dem Aufschluss (20 min) und der Einsatz des Dounce-Homogenisators und der 22G-Nadel, sollten dazu dienen, die Kontaminationen mit Nicht-*Raft*-Proteinen durch unspezifisches Aggregieren zu minimieren. Hierbei wurde in Kauf genommen, dass nur lose an *Rafts* assoziierte Komponenten von Signal- und Transportwegen, wie beschrieben [Pike, 2003], in Lösung gehen und so nicht isoliert werden.

Die Effektivität der Reinigung wurde im Anschluss an den Saccharose-Gradienten (Abb. 5.8, 5.10) anhand eines mit Anti-Caveolin-Antikörpern gefärbten Dot-Blots (Abb. 5.9, 5.11, 5.13, 5.14) der jeweiligen Fraktion bewertet. Im Gradienten war jeweils eine aufschwimmende Bande zu beobachten, die im Dot-Blot die höchste Aktivität gegenüber Caveolin aufwies.

Im Western Blot der LR-Präparation der C6-Zellen (Abb. 5.12) ist nur eine Bande bei etwa 22 kDa zu beobachten. Dies entspricht der  $\alpha$ -Isoform von Caveolin-1. Der Antikörper selbst sollte beide Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  erkennen können.

Nach der Isolierung der *Lipid raft*-Fraktionen aus kultivierten Hirnkapillarendothelzellen der Passagen 0 und 2 erfolgte eine genauere Charakterisierung der isolierten Proben. So konnte über einen Aktivitätstest der Alkalischen Phosphatase (Tab. 5.6, Abb. 5.15) die Anreicherung des GPI-verankerten Enzyms bestimmt werden. Gegenüber dem jeweiligen Rohaufschluss reicherte sich das Enzym in P0 um den Faktor 8 und in Passage 2 um den Faktor 28 an. Die Anreicherung ist also in Passage 2 sehr viel stärker, als in Passage 0. Interessanterweise zeigen dabei beide LR-Fractionen nahezu identische spezifische Aktivitäten, d. h. dass das Verhältnis der Alkalischen Phosphatase zur Gesamtproteinmenge der LR-Fraktion nahezu gleich ist.

In einem Western Blot mit Anti-Caveolin-Antikörpern (Abb. 5.18, linke Bildhälfte im Vergleich zur rechten Bildhälfte) wurde gleichfalls eine Anreicherung des Proteins in der Präparation der jeweiligen Passage festgestellt, da die Banden trotz 7 mal größerer Auftragsmenge des Rohlysats gegenüber der LR-Fraktion eine geringere Färbeintensität aufwiesen.

Aufgrund der beiden, voneinander unabhängigen Untersuchungsmethoden konnte eine spezifische Anreicherung der *Lipid raft*-Fraktion aus den Passagen 0 und 2 von kultivierten Hirnkapillarendothelzellen gegenüber dem Rohlysate festgestellt werden. Die beiden Markerproteine Alkalische Phosphatase und Caveolin-1 liegen in beiden *Lipid raft*-Fraktionen im gleichen Verhältnis vor.

Die Präparation hat sich somit als effektive Methode zur Isolierung der *Lipid raft*-Fraktion als *Detergent resistant membranes* herausgestellt.

Eine Besonderheit wurde bei der Isolierung der LR-Fraktion aus kultivierten Hirnkapillarendothelzellen festgestellt. So konnten aus P0 bei gleicher kultivierter Fläche im Vergleich zu P2 mit 1 mg die 5fache Proteinmenge an DRM gewonnen werden (Tab. 5.5), obwohl die Proteinmenge pro kultivierter Fläche in P0 nur um den Faktor 1,5 größer als in P2 war (Tab. 5.1). Dieser Unterschied kann aus vielen Ursachen resultieren. Zum einen hätte die Selektivität der Reinigung bei P0 geringer sein können. Mit den Aktivitätstests wurde jedoch gezeigt, dass dies nicht der Fall war. Andererseits hätte die Ausbeute der Präparation bei P2 niedriger sein können. Allerdings ist in Abb. 5.18 (P2) zu sehen, dass mit dem Anti-Caveolin-Antikörper in Fraktion 8, dem Rückstand der Präparation, sogar weniger Aktivität gegen Caveolin erhalten wird, als bei Fraktion 8 in Abb. 5.17 (P0). Die verschiedenen Proteinmengen lassen sich gegebenenfalls mit den beiden beobachteten Phänomenen, dem Vergrößern der Oberflächen der Zellen von P0 zu P2 und dem Vermindern der

Proteinmenge bei fortschreitender Kultivierung, erklären. Zusätzlich sind die Banden im mit Anti-Caveolin-Antikörpern gefärbten Western Blot des Rohaufschlusses bei P0 stärker, als in P2 (Abb. 5.18 linke Bildhälfte). Das Markerprotein der LR-Fraktion wird demnach bei zunehmender Kultivierung vermindert exprimiert. Da auch die Aktivität des Markerenzym, Alkalische Phosphatase abnimmt, könnte aus diesem Kenntnisstand heraus gefolgert werden, dass die LR-Fraktion in Passage 2 insgesamt quantitativ abnimmt und dieses Phänomen ein Teil der Dedifferenzierung der Zellen darstellt.

Die isolierten LR-Fraktionen wurden neben der massenspektrometrischen Analyse dazu verwendet, um eine Selektion mit einer im Rahmen dieser Arbeit etablierten *Phage-Display*-Bank durchzuführen (4.11).

Zu diesem Zweck wurde eine Bank aufgebaut, wobei verschiedene Vorgehensweisen und Gesichtspunkte bedacht werden mussten, die auch in einem Übersichtsartikel (Azzay und Highsmith, 2002 und Ref.) beschrieben und im folgenden erläutert sind. Bei der etablierten *Phage-Display*-Bank sind rekombinante Antikörper-Fragmente (scFv) mit dem Oberflächenprotein pIII als Fusionsproteine auf der Oberfläche des fd-Phagen präsentiert (*Display*). Die Antikörperfragmente sind hierbei durch Einsatz des Fuse-Vektors in das Genom des Phagen integriert worden.

Im Gegensatz zur Verwendung von sog. Phagemid-Vektoren tragen hier alle Kopien des pIII-Proteins (3-5 Kopien pro Phage) das Antikörperfragment.

Phagemid-Vektoren, Hybride zwischen Phagen- und Plasmid-Vektoren erreichen eine höhere Kopienzahl im Wirt (*E. coli*). Dem Phagemid-Vektor fehlen aber die strukturellen Komponenten des Phagen, wodurch eine Infektion mit einem nativen Phagen (sog. Helferphagen) notwendig wird. Nach Infektion und Wachstum können aus dem Überstand ebenfalls Phagen mit präsentierten Antikörpern isoliert werden, wobei allerdings nicht alle pIII-Proteine das Ak-Fragment tragen. Das Verhältnis von pIII+polypeptide : pIII-Wildtyp beträgt je nach Polypeptid und Kulturbedingungen 1:9 – 1:1000.

Ein System mit einem Phagemid-Vektor ist im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls etabliert worden, doch war die Durchführung der Selektionen gegen verschiedene Proteine aufgrund des hohen Hintergrundes der Wildtyp-Phagen nur bedingt erfolgreich. Die Probleme mit dem auftretenden Hintergrund wären durch zwei alternative Wege auszuräumen gewesen. Zunächst wurde versucht, die Bakterien mit dem Phagemid-Vektor durch einen defekten Helferphagen, der eine pIII-Deletion trägt, zu infizieren [Rondot et al., 2001], mit dem Vorteil, dass die bereits existierende Phagemid-Bank weiter nutzbar wäre. Dieser Weg wurde zunächst auch verfolgt, wobei die Präparation

des defekten Helferphagen extrem aufwendig und langwierig verlief. Der defekte Helferphage konnte schließlich auch isoliert werden, doch war dessen Produktion in *E. coli* bei weitem zu gering, um praktikabel eingesetzt zu werden. Parallel wurde eine zweite Alternative verfolgt, die den Aufbau einer neuen Bank erforderte. Hierbei wurde das Antikörperfragment in das Genom des Phagen (Fuse-Vektor) integriert. Da diese Methode erfolgreich war, wurde sich für die zuletzt angeführte Alternative entschieden. Die Generierung des Antikörperfragments basiert auf einem synthetischen Repertoire, bei dem aus humaner DNA an der CDR3 (*complement determining region*) über randomisierte Oligonukleotide eine theoretische Diversität von  $1 \cdot 10^{12}$  implementiert wurde. Bei der Ligation und Transformation war auf eine hohe Effektivität zu achten, da die Bindungsaffinität theoretisch proportional zur Anzahl der erhaltenen Klone ist. Daher wurden diese Bedingungen zunächst optimiert.

In der Literatur sind zahlreiche Möglichkeiten zur Selektion der Antikörper beschrieben. Ziel einer solchen Selektion ist es, aus der Bank ( $4 \cdot 10^7$ ) einige wenige spezifische Klone zu isolieren, die eine hohe Affinität zu einem Strukturmotiv aufweisen. Als Strukturmotiv können biotinylierte Proteine, ganze Zellen, immobilisierte Proteine auf Säulen oder Plastikgefäßen und Organismen (Mäuse) dienen. Eine *Lipid raft*-Fraktion wurde in der Literatur bisher nicht als Strukturmotiv in eine Selektion eingesetzt.

Bei den beiden durchgeführten Selektionsschritten (4.12.4) war bei der ersten Runde darauf zu achten, dass Ausbeute vor Stringenz steht. Bei der zweiten Runde wurde besonderer Wert auf die Stringenz gelegt. Die anschließende Analyse im ELISA-Test erfolgte gegen ganze Zellen, da die Menge der LR-Fraktion nicht nur begrenzt war, sondern es sich ebenfalls problematisch erwies, die Fraktion in den Kavitäten der ELISA-Platte zu immobilisieren.

Das Ergebnis des ELISA-Tests (Tab. 5.10) zeigte, dass nach zwei Runden einige Klone ein hohes Signal aufwiesen, welches auch reproduziert werden konnte. Durch Sequenzierung der Klone wurde festgestellt, dass diese Klone alle die gleiche Sequenz besaßen, welche im Anhang II mit den Variationen in der CDR3 dargestellt ist. Im Western Blot der verschiedenen LR-Fractionen (Abb. 5.53) zeigte sich eine Bande bei etwa 200 kDa. Der Phagen-Antikörper zeigte die dominante Bande der Ponceau S-Färbung, bei ihr handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Myosin. Das Bandenmuster entsprach auch der SyproRuby Färbung von P0LR und P2LR in Abb. 5.19, bei der die intensive Bande mit MALDI und LC-MS als Myosin identifiziert werden konnte. Mittels Immunhistochmie zeigte sich in kultivierten Zellen der Passage 0 (Abb. 5.54) eine spezifische Färbung, die bei einem Kontrollexperiment (Abb. 5.55) nicht aufgetreten ist. Auch bei der Färbung eines Gehirn-Schnittes (Abb. 5.56) konnte eine spezifische Färbung der Kapillare gezeigt werden. Hierbei handelt es sich vermutlich

um ein Blutgefäß, das im Gegensatz zum umgebenden Gewebe eine intensivere Färbung aufwies. Dies spiegelt auch das Ergebnis des Western Blots (Abb. 5.53) wieder, bei dem die LR-Fraktion aus P0 sehr viel intensiver gefärbt wurde, als die des Gesamtcortex und P2.

Weitere Experimente sind für eine genauere Analyse des isolierten Phagen-Antikörpers jedoch noch notwendig. So könnte beispielsweise eine Immunpräzipitation der solubilisierten LR-Fraktion durch den Phagenantikörper erfolgen, um anschließend das gefällte Protein mittels Massenspektrometrie zu identifizieren. Einen Hinweis könnte der Vergleich einer immunhistochemischen Färbung der Phagen-Antikörper mit der eines käuflich erworbenen Anti-Myosin-Antikörpers bringen.

Um auch gegen andere Proteine der LR-Fraktion eine erfolgreiche Selektion erhalten zu können, müsste dazu entweder eine Nachselektion gegen die Fraktion durchgeführt werden, oder aber das Protein der Selektion selbst nicht zugeführt werden. Letztere kann dadurch erreicht werden, dass das SDS-Gel der LR-Fraktion geblottet wird und eine Selektion gegen die geblotteten Proteine durchgeführt wird [Liu und Marks, 2000]. Hierbei könnten unerwünschte Proteine aus der Membran durch Ausschneiden entfernt werden und gegen die verbleibende Membran eine Selektion durchgeführt werden.

Ein Schwerpunkt der Arbeit beinhaltete, die massenspektrometrische Analyse der *Lipid raft*-Fraktionen aus den C6- und den kultivierten Hirnkapillarendothelzellen der Passagen 0 und 2.

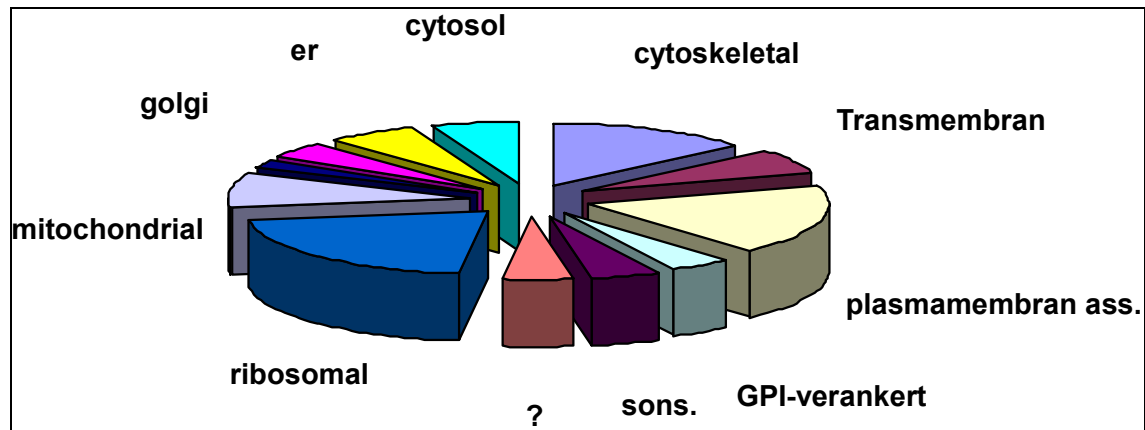
Zur Etablierung des durchgeführten Verfahrens wurde die LR-Fraktion der C6-Zellen auf einem Gradientengel aufgetragen (Abb. 5.18) und in einem ersten Ansatz mit einzelnen Banden eine MALDI-Analyse durchgeführt. Nach der Auswertung der Messdaten wurden für den weiteren Verlauf der Arbeit zwei wichtige Erkenntnisse gewonnen. Erstens handelt es sich mit Ausnahme von Aktin (Tab. 5.7) ausschließlich um Membran- bzw. membranassoziierte Moleküle. Besonders interessant ist hierbei das in Bande A identifizierte Ceruloplasmin, welches nicht nur eine GPI-verankerte Ferroxidase darstellt, sondern auch spezifisch für Astrozyten ist [Patel et al., 2000]. Als zweites wichtiges Resultat konnte die Anwesenheit weiterer Proteine in der isolierten Bande gezeigt werden (Abb. 5.19), so dass eine Trennung der Peptide aus den isolierten Banden notwendig war.

Folglich wurden sowohl die LR-Fraktion der C6-Zellen, als auch die LR-Fraktion der kultivierten Hirnkapillarendothelzellen von P0 und P2 mittels GeLC-MS analysiert (Abb. 5.22).

Die dabei identifizierten Proteine sind in Anhang I tabellarisch aufgelistet. Aus dem Gel der C6-LR-Fraktion konnten 168 verschiedene Proteine (Tab. I.1) nachgewiesen

werden. Von den *Lipid rafts* der Passagen 0 bzw. 2 wurden 59 (Tab.1.2) Proteine bzw. 40 (Tab.1.3) Proteine detektiert.

Nach Recherchen in Datenbanken konnte eine vorläufige Klassifizierung der Proteine aus der C6-LR-Fraktion nach ihrer subzellulären Lokalisation vorgenommen werden.



**Abb. 6.1:** Subzelluläre Verteilung der 168 identifizierten Proteine aus der Lipid raft-Fraktion der C6-Zellen.

Hinsichtlich der subzellulären Verteilung bei den LR-Proteinen der C6-Zellen (Abb 6.1) fällt auf, dass neben dem hohen Anteil der cytoskeletalen und plasmamembran-assoziierten Proteine auch eine wesentliche Zahl an ribosomalen Proteinen identifiziert worden ist, wobei einige ribosomalen Proteine als durchaus spezifisch für diese Fraktion angesehen werden [Foster et al., 2003]. Die Tatsache, dass auch Proteine des Golgi-Apparates und des ERs gefunden wurden, ist nicht unerwartet, da die Proteine der *Rafts* intrazellulär prozessiert werden. Von den nachgewiesenen Proteinen der C6-LR-Fraktion (Anhang I) sind einige im folgenden hervorgehoben:

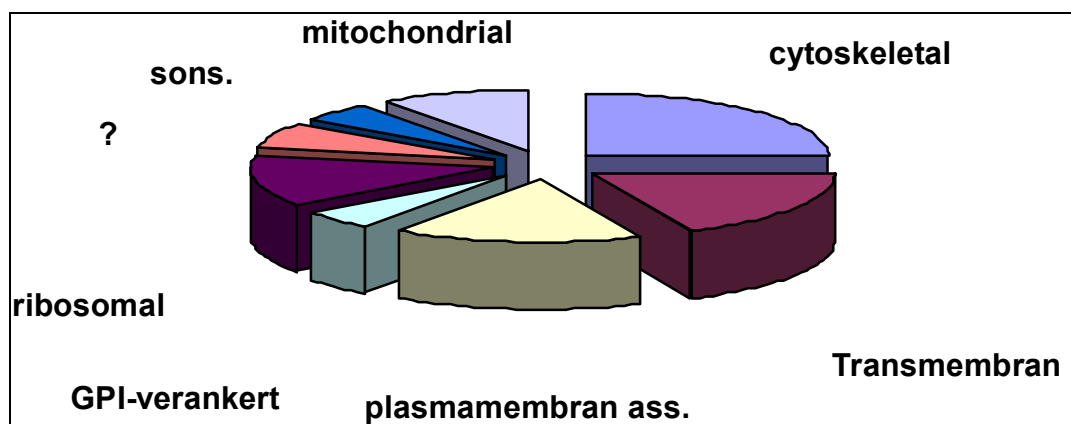
Als Bestätigung der Methode kann vor allem die Identifizierung der Markerproteine Caveolin-1 und Flotilin-1/-2 angesehen werden. Die Existenz des Caveolins konnte auch mittels Western Blot gezeigt werden (Abb. 5.12). Daneben wurden Untereinheiten verschiedener G-Proteine nachgewiesen. Auffällig ist auch der hohe Anteil der Chaperone, wobei beispielsweise das HSP70 zur LR-Fraktion gezählt wird [Foster et al., 2003]. Der hohe Anteil könnte möglicherweise dadurch begründet sein, dass diese Proteinfamilie wichtige Funktionen bei der Prozessierung der Proteine erfüllt.

Mit dem Integrin 1-beta, dem Cadherin 13 und dem Neuronalen Zell Adhäsions Protein sind auch funktionelle Bestandteile der Zell-Zell-Kommunikation gefunden worden.

Schließlich sind noch die wichtigen funktionellen Träger der Astrozyten, wie das *glial fibrillary acidic protein* und das *GPI-anchored ceruloplasmin* aus der Reihe der detektierten Proteine hervorzuheben.

Bei dem Gel der kultivierten Hirnkapillarendothelzellen aus P0 und P2 (Abb. 5.20 u. 5.21) ist zunächst der geringe Unterschied zwischen den beiden Fraktionen aufgefallen, was darauf hindeutet, dass es sich um eine zumindest ähnliche Zusammensetzung der beiden Fraktionen handelt. So scheinen sich die beiden Fraktionen mehr quantitativ, als qualitativ zu unterscheiden, wie auch anhand der isolierten Menge der Fraktionen beider Passagen gezeigt werden konnte (Tab. 5.5). Dennoch wurde versucht, einen qualitativen Vergleich zwischen den beiden Passagen auf Ebene der DRM zu ziehen.

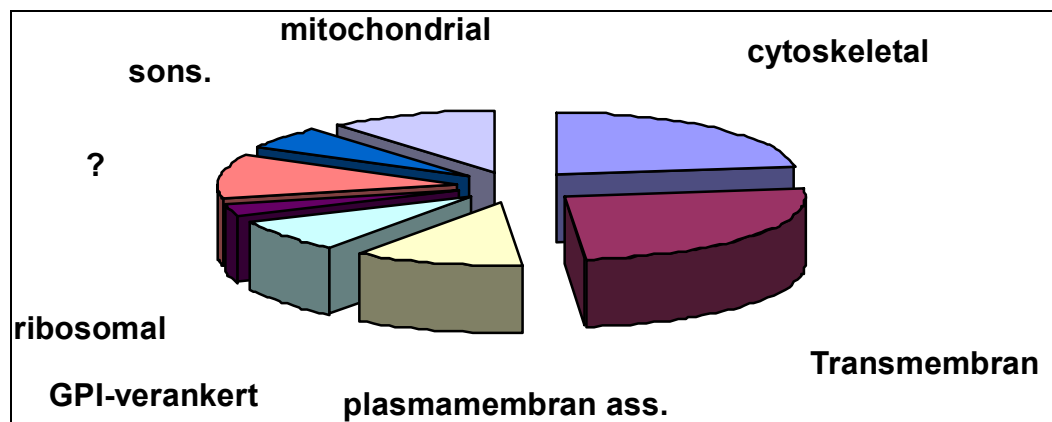
Bisher sind keine Experimente zur qualitativen Unterscheidung zweier Proben mittels LC-MS beschrieben worden. Demnach war für diese Art des Vergleichs zunächst ein Protokoll zu entwickeln (5.4). Insgesamt zeichnete sich die Methode durch die Reproduzierbarkeit der durchgeführten Analysen aus. Bei der Identifizierung der Proteine aus den LR-Fractionen ist zunächst die im Vergleich zu den C6-Zellen geringe Anzahl an unterschiedlichen Proteinen zu bemerken. Im folgenden ist sowohl die subzelluläre Verteilung der identifizierten Proteine von P0LR als auch die von P2LR dargestellt.



**Abb. 6.2:** Subzelluläre Verteilung der 59 identifizierten Proteine aus der Lipid raft-Fraktion kultivierter Hirnkapillarendothelzellen der Passage 0.

Im Gegensatz zu der LR-Fraktion der C6-Zellen (Abb. 6.1) ist der Anteil der Transmembran- und Plasmamembran-assoziierten Proteine in den BMEC der Passagen 0 (Abb. 6.2) und 2 (Abb. 6.3) sehr viel höher. So beträgt der Anteil dieser beiden, zusammen mit den GPI-verankerten Proteinen mehr als ein Drittel der identifizierten Proteine. Ein Viertel der Proteine in beiden Passagen entfällt jeweils auf Bestandteile des Cytoskeletts. Die Anzahl der ribosomalen Proteine ist dagegen sehr gering. Schon die nahezu identische subzelluläre Verteilung der Proteine spiegelt die

Ähnlichkeit der beiden Fraktionen wieder, die bereits im gefärbten Gel (Abb. 5.20) sichtbar war.



**Abb. 6.3:** Subzelluläre Verteilung der 40 identifizierten Proteine aus der Lipid raft-Fraktion kultivierter Hirnkapillarendothelzellen der Passage 2.

Das dominanteste Protein in P0, welches vermutlich auch von den selektierten Phagen-Antikörpern erkannt wird, ist das *non-muscle*-Myosin. Myosin fungiert als molekularer Motor in den Muskel- und den meisten Nicht-Muskel-Zellen. Der Grund, warum es in den LR von P0 sehr viel stärker exprimiert wird, als in denen von P2 könnte darin liegen, dass sich in Passage 0 die frisch isolierten Zellen gerade einen Tag in Kultur befanden und daher noch Anpassungsvorgänge des Cytoskeletts vorgenommen wurden. Allerdings fällt die Färbung des Gehirnschnitts mit dem Phagenantikörper (Abb. 5. 55) im Blutgefäß ebenfalls sehr viel intensiver aus, als beim umgebenden Parenchymalgewebe gefärbt ist. Daher ist eine verminderte Exprimierung dieses Proteins in Kultur aufgrund der unterschiedlichen Bedingungen wahrscheinlich.

Der hohe Anteil cytoskeletaler Proteine deutet darauf hin, dass die *Rafts* nicht frei auf der Oberfläche der Plasmamembran treiben, sondern mit dem Cytoskelett verbunden sind. Hierzu wurde für Neutrophile ein Modell aufgestellt [Nebt et al., 2002], welches unter anderem Aktin und Myosin als Bestandteile eines Membranskeletts beschreibt. Dieses soll die Organisation und/oder den Transport von Signaldomänen regulieren. Hierbei wurde dem Myosin und dem sog. Supervillin eine sehr nahe Position an den *Rafts* zugeschrieben.

Auch bei den kultivierten Hirnkapillarendothelzellen wurden zahlreiche Untereinheiten der G-Proteine identifiziert. *In vitro*-Studien mit Epithelzellen zeigten, dass die G-Proteine eine essentielle Rolle in der Aufrechterhaltung der Barriere-Eigenschaften spielen [Denker et al., 1996].



Außerdem wurden Untereinheiten der vakuolaren ( $H^+$ )-ATPase nachgewiesen, welche in intrazellulären Kompartimenten den pH-Wert erniedrigt. Dieser Prozess ist notwendig für die Rezeptor-vermittelte Endocytose, den zielgerichteten Transport lysosomaler Proteine und für die Prozessierung und den Abbau von Proteinen [Arata et al., 2002].

In den LR von BMECP0 und BMECP2 wurde außerdem durch LC-MS die Lokalisation der Alkalischen Phosphatase verifiziert, welche zuvor durch einen enzymatischen Aktivitätstest (5.3) untersucht wurde.

Bei 4 Kandidaten (Caveolin-1, GLUT1, ABCG2, hypothetisches Protein FLJ20625) der identifizierten Proteine aus den DRM kultivierter Hirnkapillarendothelzellen wurden weitere Untersuchungen durchgeführt.

Das hypothetische Protein wurde lediglich in Passage 0 mittels LC-MS detektiert. Da kein Antikörper für einen Western Blot zur Verfügung stand, existierte nur auf Ebene der Transkription eine Vergleichsmöglichkeit zu anderen Kulturzuständen. Hierbei wurde festgestellt, dass das Gen in Kultur höher exprimiert wird, als bei frisch isolierten BMEC (Abb. 5.50). Die Transkriptmenge ist relativ zur 18SrRNA in P2 gegenüber P0 sogar um etwa 20 % gestiegen. Die widersprüchlichen Ergebnisse aus den LC-MS- und den *Real time*-Experimenten können verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte der LC-Lauf lückenhaft gewesen sein, so dass das Protein in der Passage 2 nicht nachgewiesen worden ist. Zum anderen könnte das Protein in Passage 2 einer alternativen Regulation unterworfen worden sein, welche bewirkt, dass es nicht mehr in der LR-Fraktion lokalisiert ist.

Auffällig ist, dass auf Transkriptionsebene ein ähnlicher Effekt bei Caveolin zu beobachten ist (Abb. 5.50). Die Identifizierung des Markerproteins Caveolin erfolgte in beiden LR-Fractionen der kultivierten Hirnkapillarendothelzellen. Das Gen wird ebenfalls bei fortlaufender Kultivierung stärker exprimiert. Jedoch ist hier der Effekt sehr viel größer, als beim hypothetischen Protein. Die Expression des Caveolin-Gens ist dabei in P2 mehr als doppelt so hoch wie in P0 (Abb. 5.50). Wohingegen Western Blot (5.17, linke Bildhälfte) als auch Immunfärbung (Abb. 5.34 und 5.35) zeigten, dass das Protein in P0 etwas höher, als in P2 exprimiert wurde. Dies könnte daraufhin weisen, dass die Expression auf posttranskriptionaler Ebene reguliert wird. So könnte das Protein z. B. ohne posttranslationale Modifikationen extrem kurzlebig sein. Wie von Parat und Fox (2001) gezeigt wurde, wird Caveolin-1 posttranslational an den Cys-Seitenketten palmitoyliert. Im Gegensatz zu anderen palmitoylierten Proteinen wie den  $\alpha$ -Untereinheiten der G-Proteine verläuft bei Caveolin-1 diese posttranslationale Modifikation irreversibel und scheint nur bei gerade synthetisiertem Caveolin zu erfolgen.

Die Expression von Caveolin-1 verstärkt die Bildung des Kapillarrohres, wobei Wachstumsfaktoren, die die Proliferation der Endothelzellen induzieren, die Expression von Caveolin-1 vermindern. Somit scheint das Caveolin-1, je nach Differenzierungsstadium unterschiedlich reguliert zu werden und spielt in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle bei der Regulation dieser Differenzierung. Diese Tatsache wurde sowohl durch eine Überexpression des Proteins, als auch durch eine gezielte Verminderung der Expression gezeigt, was sich auf die Geschwindigkeit der Kapillarrohrbildung auswirkte [Liu et al., 2002].

Caveolin-1 wird darüber hinaus als negativer Regulator des Zell-Zyklus angesehen. In durch Onkogenese transformierten Zellen wird es herunterreguliert [van Deurs et al., 2003 und Ref.],

Auf der anderen Seite wird berichtet, dass Caveolin-1 in Zellen, die eine *Multi-drug resistance* entwickelt haben, hochreguliert ist [Lavie et al., 1998]. Hiermit erlangen transformierte Zellen wieder einen wichtigen Marker einer differenzierten Zelle.

Zusammenfassend lässt sich bezüglich des Caveolins sagen, dass zur genaueren Untersuchung zunächst Zeitreihen der Expression durchgeführt werden müssten, die sowohl auf Transkript-, als auch auf Proteinebene stattfinden. Hinsichtlich der unterschiedlichen Expression bei der Angiogenese wären vor allem unterschiedliche Stadien der Konfluenz von Interesse.

Der Glukosetransporter GLUT1 wurde in den Fraktionen BMEC-P0LR (Tab. 5.6) und BMEC-P2LR (Tab. 5.7) mittels ESI identifiziert, also auch die geringe Menge GLUT1, die mittels Western Blot in P2LR detektiert wurde. Dies zeigt, dass die verwendete massenspektrometrische Methode (LC-MS) extrem sensitiv ist. Aber es zeigt auch, dass das angewendete Verfahren nicht quantitativ ist.

Im Western Blot mit GLUT1-Antikörpern (Abb. 5.38) trat eine breite Bande bei 55 kDa auf. Auch bei der LC-MS-Analyse wurde GLUT1 in etwa dieser Höhe detektiert. Somit wurde die hochglykosylierte BMEC-spezifische Isoform [Vannucci et al. 1997] gefunden. Durch ultrastrukturelle Untersuchungen [Cornford et al. 1994] wurde entdeckt, dass GLUT1 nicht nur auf Transkriptions- und Translationsebene reguliert wird, sondern die Modulierung der Transportaktivität auch durch Translokation von der Plasmamembran ins Cytosol erfolgt. In welcher Weise sich dabei die Lipid-Zusammensetzung ändert, ist noch nicht geklärt. Diese Frage wäre im Hinblick auf die Zugehörigkeit des Proteins zur LR-Fraktion von Bedeutung und es wäre in diesem Zusammenhang zu klären, ob die Co-Fraktionierung der *in vivo*- Situation entspricht.

Auf Ebene der Transkription ist hauptsächlich der Unterschied zwischen frisch isolierten Kapillaren (fBMEC) und kultivierten Endothelzellen (cBMEC) betrachtet worden. So wurde beobachtet [Weiler-Güttler et al. 1989], dass der Glukosetransporter

GLUT1 in fBMEC höher exprimiert wird, als in cBMEC. Im Gegensatz zur  $\gamma$ -GT und der Alkalischen Phosphatase auf enzymatischer Ebene sinkt der mRNA-Spiegel jedoch nicht mit fortlaufender Kultivierung, sondern bleibt weitgehend unverändert. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit mittels *Real time*-PCR bestätigt werden, denn die Expression von GLUT1 beträgt in P0 65% und in P2 77% der Menge des Transkriptes in fBMEC (Abb. 5.50), was einer nahezu identischen Expression in P0 und P2 entsprechen würde.

So unterscheidet sich auch bei diesem Protein die Menge des Transkriptes und des exprimierten Proteins. Die Expression des Proteins wurde neben dem Western Blot durch die immunhistochemische Färbung mit Anti-GLUT1 in Passage 0 und in Passage 2 (Abb. 5.39 und Abb. 5.40) gezeigt. Eine Co-Fluoreszenz mit der Anti-Caveolin-Immunfärbung konnte dabei nicht beobachtet werden (o. Abb.).

Als weiteres Protein wurde das ABCG2 näher charakterisiert. Es gehört zur Familie der ABC-Transport-Proteine und stellt einen sog. Halbtransporter dar. In humanem Gewebe wird es auch als *breast cancer resistance protein* bezeichnet und im Schwein wurde ein Homolog dessen (86 % Sequenzidentität) als sog. *brain multidrug resistance protein* (BMRP) [Eisenblätter et al., 2002] benannt. Mittels LC-MS konnten Peptide dieses Proteins identifiziert werden (Anhang III), welche sich laut Analyse der Primärsequenz [Eisenblätter et al., 2002] alle im cytosolischen Teil des Proteins, insbesondere in der ATP-Binde-Kassette (Anhang III, grau unterlegter Sequenzabschnitt) befinden. Der verwendete monoklonale Antikörper gegen das humane BCRP (anti-BXP21) ist gegen eine rekombinant erzeugte Sequenz (AS 271-396) des Proteins gerichtet (Anhang III, unterstrichener Sequenzabschnitt). Die Homologie zur Sequenz des BMRP beträgt in diesem Abschnitt lediglich 70 %.

Bei der Färbung des Hirnschnittes (Abb. 5.47.) sind neben dem gefärbten Blutgefäß besonders die hell umrandeten Löcher am oberen Bildrand auffällig. Bei diesen handelt es sich vermutlich um gefärbte Hirnkapillaren im Querschnitt, da die Färbemuster und die Größe einem mit Anti-Pgp gefärbten Hirnschnitt gleichen [Virgintino et al., 2002].

Der Antikörper erkennt im Western Blot des Gesamtproteins aus kultivierten Hirnkapillarendothelzellen des Schweins (Abb. 5.44) eine Bande bei etwa 200 kDa. Hierbei liegt in P0 eine deutlich intensivere Bande, als in P2 vor. Bei der Untersuchung der Menge des exprimierten Transkriptes ist ebenfalls festgestellt worden, dass von dem Gen mehr in P0 als in P2 exprimiert wird (Abb. 5.50). Die ähnliche Tendenz dieser beiden Experimente deutet auf eine ähnliche (Post)-Transkriptionskontrolle, wie auch beim Pgp hin [Borst und Elferink, 2002].

Allerdings tritt beim durchgeführten Western Blot (Abb. 5.44) mit der Bande bei 200 kDa ein Widerspruch zur theoretischen Masse des Transporters auf, die lediglich 72

kDa beträgt. Der vermeintlich gleiche Antikörper färbt in humanem Gewebe eine Bande bei etwa 70 kDa an [Cooray et al., 2002], was auch den Herstellerangaben entspricht. Bei der bisher einzigen beschriebenen Anwendung des Antiköpers auf kultivierten Hirnkapillarendothelzellen des Schweins [Eisenblätter et al., 2003], wird lediglich eine immunhistochemische Färbung abgebildet, die sich zu den in dieser Arbeit gezeigten Färbungen sowohl von Passage 0 (Abb. 5.45) als auch von Passage 2 (Abb. 5.46) unterscheidet. In der Veröffentlichung sind die Zellränder ähnlich einer ZO-1-Färbung (Abb. 5.3) markiert, wobei jedoch nicht die gleiche Färbeintensität wie bei der ZO-1-Färbung erreicht wird. Zusätzlich ist der gesamte Zellkörper noch mit dem Antikörper markiert. Diese Abweichung von den hier abgebildeten Färbungen könnte aus den unterschiedlichen Kultur- und Fixierbedingungen resultieren. Eine Abbildung eines Western Blots wurde nicht dargestellt.

Bei einem Western Blot der LR-Fraktion, der immunchemisch mit dem Antikörper (BXP-21) gefärbt wurde, ergab sich kein Signal (o. Abb.). Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen der LC-MS-Analyse insofern nicht überein, dass über die LC-MS-Analyse trotzdem Peptide des Proteins identifiziert wurden.

Jedoch ist die Spezifität des Antiköpers auf das ABCG2, wie beschrieben, nicht eindeutig. Die Wahrscheinlichkeit, dass es zu einem Auftreten von Fehlern im Laufe des LC-MS-Experiments gekommen sein könnte, ist gering, da die Peptide in mehreren Banden nachgewiesen wurden. In den Banden konnten zudem auch mehrere verschiedene Peptide erkannt werden (Abb. 5.43; Anhang: Tab. III.2). So befanden sich bei einer molekularen Masse von etwa 200 kDa (Banden 3,4 und 6), 70-100 kDa (Banden 12-16) und etwa 30 kDa (Banden 30 und 32) Peptide des BMRPs. Der erste Massenbereich würde einem ganzen ABC-Transporter oder 2 Halb-ABC-Transportern entsprechen. Der zweite Massenbereich könnte durch einen oder mehrere Halbtransporter abgedeckt sein. Die Region vom *N*-Terminus bis zum Ende der ATP-Bindekassette besitzt eine theoretische Masse von 30 kDa, was ungefähr mit den Ergebnissen aus den Banden P0\_30 und P0\_32 (Abb. 5.43) übereinstimmt. Diese Resultate weisen darauf hin, dass zumindest ein ABC-Transporter in den LR-Fraktionen lokalisiert ist, der identisch oder homolog zu den beschriebenen BMRP [Eisenblätter et al., 2002] ist.

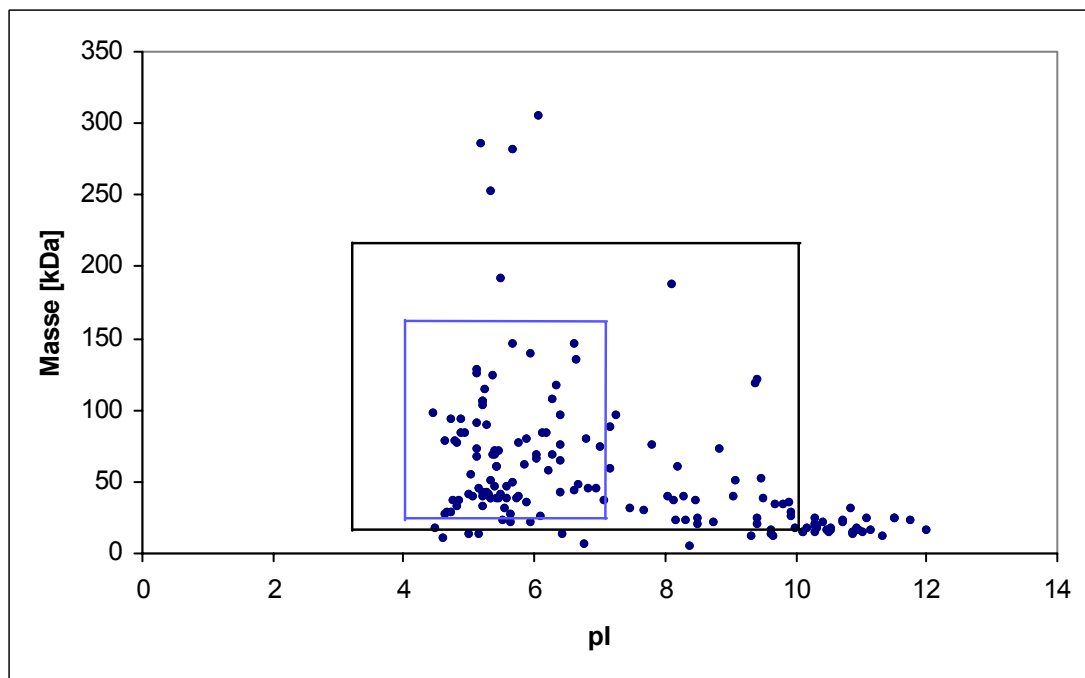
Allerdings wurden mittels einer Datenbankrecherche über den BLAST-Algorithmus neben dem ABCG2-Protein keine Sequenzabschnitte gefunden, die eine hohe Homologie zu den identifizierten Proteinen aufweisen. Doch könnte es sich hierbei auch einen unbekannten ABC-Transporter handeln oder um ABC-Transporter, deren Sequenz im Schwein nicht bekannt ist.

Bisher wurde lediglich das Pgp als in den Caveolae vorhandenes Protein beschrieben. Die Co-Lokalisation von Pgp und Caveolin-1 ist nicht nur durch Co-Fraktionierung und Immunpräzipitation der Proteine gezeigt [Demeule et al., 2000] worden, sondern auch mittels konfokaler Laser-scanning Mikroskopie [Virgintino et al., 2002]. Hierbei wurde demonstriert, dass diese Co-Lokalisation nur auf der luminalen Seite des Kapillarrohres existiert, da Pgp im Gegensatz zum gleichmäßig verteilten Caveolin nur auf der luminalen Seite lokalisiert ist. Außerdem wurde bei dem Pgp die sog. Caveolin-Bindedomäne nachgewiesen ( $\phi x \phi x x x x \phi x x \phi$ ), wobei  $\phi$  für Phe, Tyr oder Trp und x für jede andere Aminosäure steht.

Das Auftreten der Caveolin-Bindedomäne konnte im Rahmen dieser Arbeit auch in der Sequenz des BMRP gefunden werden. Die Sequenz YGFSALQYNEF (Anhang: AS 577-588) erfüllt die Bedingung der Caveolin-Binde-Domäne. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass das BMRP in den *Rafts* vorliegt. Zusätzlich bedeutet dies, dass neben dem Pgp weitere ABC-Transporter durch Caveolin reguliert werden könnten. Doch kann ein endgültiger Beweis erst durch einen geeigneten Antikörper gegen das BMRP, oder besser gegen die ATP-Bindekassette erbracht werden. Durch Immunpräzipitation ließen sich die Proteine mit der ATP-Bindekassette anreichern und nachfolgend mittels Massenspektrometrie genauer charakterisieren. Durch diese Präzipitation wäre auch die Co-Lokalisation mit Caveolin exakter zu untersuchen.

Die Massenspektrometrie hat sich im Rahmen dieser Arbeit als unerlässliches Werkzeug zur Identifizierung von Proteinen bewährt. Insbesondere über LC-MS konnten aus komplexen Proteingemischen zahlreiche Peptide der einzelnen Proteine bestimmt werden. Bei der Chromatographie (nano-HPLC) kann mittlerweile eine Trenneffektivität von  $10^5$  Trennstufen pro Säule erreicht werden, wobei die Trennzeit nur 30 – 60 min beträgt [Romijn et al., 2003]

In Abb. 6.4 sind die entsprechenden Proteine der C6-LR in einem 2D-Diagramm aufgetragen. Sie sind hierbei nach ihrem theoretischen pI und ihrer Masse geordnet, die aus der primären Aminosäuresequenz ermittelt wurden. Mit den darin enthaltenen Rechtecken werden die Grenzen der konventionellen 2D-Technologie dargestellt. Selbst bei Verwendung mehrerer pH-Bereiche in der ersten Dimension und beim Einsatz von Gradientengelen in der zweiten Dimension, wären nicht alle Proteine erfassbar gewesen. Dies hat einen erheblichen Informationsverlust zur Folge, trotz der Tatsache, dass es sich bei den stark basischen Proteinen vornehmlich um ribosomale Proteine handelt.



**Abb. 6.5:** Virtuelles 2D-Gel der identifizierten Proteine der C6-LR-Fraktion aufgetragen nach theoretischer Ladung (pI) und Masse. Die Rahmen geben die durch konventionelle 2D-Gele erfassbaren Bereiche wieder. Blau durch ein einzelnes Experiment; schwarz einen durch mehrere Gele erfassbarer Bereich.

Bei dem Diagramm wird allerdings nicht die Hydrophobizität der Proteine berücksichtigt. Diese spielt eine erhebliche Rolle dabei, ob ein Protein in einem 2D-Gel aufgelöst werden kann. Bei den hier untersuchten Fraktionen handelt es sich um eine Anreicherung von hydrophoben Proteinen, welche im Allgemeinen mittels 2D-Elektrophorese unzureichend untersucht werden können. Alternativ sind sog. 16-BAC/SDS 2D-Gele zur Auflösung von Membranproteinen anwendbar [Hartinger et al. 1998], doch stellte sich deren Auflösungsvermögen im Rahmen dieser Arbeit als zu gering heraus.

Bei der Abb. 6.5 sind bei den theoretischen Berechnungen keine posttranslationalen Modifikationen berücksichtigt worden, welche in Verschiebungen der Masse und des pIs der Proteine resultieren.

Ein Problem bei der durchgeführten Analyse mittels LC-MS bestand darin, dass nur Peptide identifiziert werden konnten, die in genomischen oder proteinchemischen Datenbanken annotiert waren. Zwar liegt die Sequenzhomologie zwischen Mensch und Schwein bei über 90 %, allerdings wären von dem identifizierten ABCG2 nur zwei statt der neun Peptide bei alleiniger Kenntnis der humanen Sequenz gefunden worden. Da das Genom des Schweins bisher nicht vollständig aufgeklärt ist, konnten lediglich

Peptide aus Bereichen hoher Homologie mit Proteinen bekannter Sequenz anderer Spezies oder aus bereits sequenzierten Genen/Proteinen des Schweins ermittelt werden. Dies könnte auch die Tatsache erklären, dass bei den C6-Zellen (Ratte) wesentlich mehr Proteine erkannt wurden, als bei den kultivierten Hirnkapillarendothelzellen (Schwein). Bei der Ratte, einem häufig verwendeten Tiermodell, sind mehr Sequenzen annotiert.

Alternativ hätte mit den erhaltenen Peptiden noch eine Homologie-Suche durchgeführt werden können, doch würde dies gegebenenfalls zu einer Absenkung der Spezifität der erhaltenen Treffer führen.

Insgesamt hat sich die Isolierung der *Lipid rafts* als DRM als geeignete Methode zur Anreicherung von Signal- (z.B. G-Proteine) und Transportproteinen (z.B. GLUT1 und ABCG2) herausgestellt. Bei einem Vergleich der Ergebnisse mit anderen beschriebenen LR-Anreicherungen ist auf die dabei angewendete Methode zu achten. Mittels LC-MS erfolgte zudem erfolgreich die Identifizierung zahlreicher Proteine dieser Fraktion aus kultivierten Hirnkapillarendothelzellen. Aufgrund der Tatsache, dass unterschiedliche Mengen der LR aus den Passagen 0 und 2 kultiverter BMEC isoliert wurden, wäre eine weiterführende Quantifizierung der nachgewiesenen Proteine auf massenspektrometrischer Ebene über eine Isotopenmarkierung wünschenswert. Schließlich konnte auch das *Phagen Display* als vielversprechende Technik im Rahmen dieser Arbeit etabliert werden.

Dass die mRNA-Menge und die Menge des exprimierten Proteins nicht immer korrelieren [Anderson und Seilhammer, 1997], wurde am Beispiel der 4 Kandidaten (Caveolin-1, GLUT1, ABCG2, hypothetisches Protein FLJ20625) gezeigt. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, einer Proteomanalyse und beweist gleichzeitig, dass diese Methode trotz des größeren praktischen Aufwandes unerlässlich für die Erforschung biochemischer Prozesse ist.

## 7. Literatur

Abbott N.J., Romero I.A.

“Transporting therapeutics across the blood-brain barrier“

*Mol. Med. Today*. 1996, **2**, 106-13.

Abbott N.J.

“Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability“

*J. Anat.* 2002, **200**, 629-38.

Agus D.B., Gambhir S.S., Pardridge W.M., Spielholz C., Baselga J., Vera J.C., Golde D.W.

“Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters“

*J. Clin. Invest.* 1997, **100**, 2842-8.

Ambudkar S.V., Dey S., Hrycyna C.A., Ramachandra M., Pastan I., Gottesman M.M.

“Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter“

*Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999, 361-98.

Ambudkar S.V.

“Drug-stimulatable ATPase activity in crude membranes of human MDR1-transfected mammalian cells“

*Methods. Enzymol.* 1998, 504-14.

Anderson, L., Seilhamer, J.

“A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver“

*Electrophoresis* 1997, **18**, 533-37.

Anderson R.G.

“The caveolae membrane system“

*Annu. Rev. Biochem.* 1998, **67**, 199-225.

Anderson R.G., Kamen B.A., Rothberg K.G., Lacey S.W.

“Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae“

*Science* 1992, **255**, 410-1.

Arata Y., Nishi T., Kawasaki-Nishi S., Shao W., Wilkens S., Forgac M.

“Structure, subunit function and regulation of the coated vesicle yeast vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPase“

*Biochim. Biophys. Acta*. 2002, **1555**, 71-4.

Asaba H., Hosoya K., Takanaga H., Ohtsuki S., Tamura E., Takizawa T., Terasaki T.

“Blood-brain barrier is involved in the efflux transport of a neuroactive steroid, dehydroepiandrosterone sulfate, via organic anion transporting polypeptide 2“

*J. Neurochem.* 2000, **75**, 1907-16.

Azzazy H.M., Highsmith W.E. Jr.

“Phage display technology: clinical applications and recent innovations“

*Clin. Biochem.* 2002, **35**, 425-45.

Babitt J., Trigatti B., Rigotti A., Smart E.J., Anderson R.G., Xu S., Krieger M.

“Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N- glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae“

*J. Biol. Chem.* 1997, **272**, 13242-9.



Beck W.T., Cirtain M.C.

"Continued expression of vinca alkaloid resistance by CCRF-CEM cells after treatment with tunicamycin or pronase"

*Cancer Res.* 1982, **42**, 184-9.

Bell G.I., Kayano T., Buse J.B., Burant C.F., Takeda J., Lin D., Fukumoto H., Seino S.

"Molecular biology of mammalian glucose transporters"

*Diabetes Care* 1990, **13**, 198-208.

Biedler J.L., Riehm H.

"Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies"

*Cancer Res.* 1970, **30**, 1174-84.

Biemann K.

"Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure

*Biomed. Environ. Mass. Spectrom.* 1988, **16**, 99-111.

Bilderback T.R., Gazula V.R., Lisanti M.P., Dobrowsky R.T.

"Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways"

*J. Biol. Chem.* 1999, **274**, 257-63.

Blum, M., Beier, H., Gross, H.J.

"Improved silverstaining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels"

*Electrophoresis* 1987, **8**, 93-9.

de Boer A.G., van der Sandt I.C., Gaillard P.J.

"The role of drug transporters at the blood-brain barrier"

*Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2003, 629-56.

Borst P., Zelcer N., van Helvoort A.

"ABC transporters in lipid transport"

*Biochim. Biophys. Acta.* 2000, **1486**, 128-44.

Borst P., Elferink R.O.

"Mammalian ABC transporters in health and disease"

*Annu. Rev. Biochem.* 2002, **71**, 537-92.

Bradford, M.M.

"A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye protein binding"

*Anal. Biochem.* 1976, **72**, 248-54.

Brown D.A., Rose J.K.

"Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface"

*Cell* 1992, **68**, 533-44.

Brown D.A., London E.

"Functions of lipid rafts in biological membranes"

*Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1998, **14**, 111-36.

Brown D.A., London E.

"Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts"

*J. Biol. Chem.* 2000, **275**, 17221-4.

Burlingame A.L., Boyd R.K., Gaskell S.J.

"Mass spectrometry"

*Anal. Chem.* 1998, **70**, 647R-716R..

Bunting K.D., Galipeau J., Topham D., Benaim E., Sorrentino B.P.

"Effects of retroviral-mediated MDR1 expression on hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation in culture"

*Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1999, **872**, 125-40.

Burnette W.N.

"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A"

*Anal. Biochem.* 1981, **112**, 195-203.

Butt A.M., Jones H.C., Abbott N.J.

"Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study"

*J. Physiol.* 1990, **429**, 47-62.

Chang G., Roth C.B.

"Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters"

*Science* 2001, **293**, 1793-800.

Charron M.J., Brosius F.C. 3rd, Alper S.L., Lodish H.F.

"A glucose transport protein expressed predominately in insulin-responsive tissues"

*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1989, **86**, 2535-9.

Clarke D.D., Sokoloff L. 1994,

"circulation and energy metabolism of the brain". basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects. Raven press, New York

Chervet J.P., Ursem M., Salzmann J.P.,

"Instrumental requirements for nanoscale liquid chromatography"

*Anal. Chem.* 1996, **68**, 589-608.

Cornford E.M., Hyman S., Swartz B.E.

"The human brain GLUT1 glucose transporter: ultrastructural localization to the blood-brain barrier endothelia"

*J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 1994, **14**, 106-12.

Cornford E.M., Hyman S.

"Blood-brain barrier permeability to small and large molecules"

*Adv. Drug. Deliv. Rev.* 1999, **36**, 145-63.

Cremer J.E.

"Substrate utilization and brain development"

*J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 1982, **2**, 394-407.

Davis M.T., Stahl D.C., Hefta S.A., Lee T.D.

"A microscale electrospray interface for on-line, capillary liquid chromatography/tandem mass spectrometry of complex peptide mixtures"

*Anal. Chem.* 1995, **67**, 4549-56.

Decleves X., Regina A., Laplanche J.L., Roux F., Boval B., Launay J.M., Scherrmann J.M.

"Functional expression of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein (Mrp1) in primary cultures of rat astrocytes"

*J. Neurosci. Res.* 2000, **60**, 594-601.

Demeule M., Jodoin J., Gingras D., Béliveau R.

"P-glycoprotein is localized in caveolae in resistant cells and in brain capillaries"

*FEBS Lett.* 2000, **466**, 219-24.

Denker B.M., Nigam S.K.

"Molecular structure and assembly of the tight junction"

*Am. J. Physiol.* 1998, **274**, F1-9.

Dey S., Ramachandra M., Pastan I., Gottesman M.M., Ambudkar S.V.

"Evidence for two nonidentical drug-interaction sites in the human P-glycoprotein"

*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1997, **94**, 10594-9.

Dietzen D.J., Hastings W.R., Lublin D.M.

"Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae"

*J. Biol. Chem.* 1995, **270**, 6838-42.

Demeule M., Regina A., Jodoin J., Laplante A., Dagenais C., Berthelet F., Moghrabi A., Beliveau R.

"Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain barrier"

*Vascul. Pharmacol.* 2002, **38**, 339-48.

Dean M., Allikmets R.

"Complete characterization of the human ABC gene family"

*J. Bioenerg. Biomembr.* 2001, **33**, 475-9.

van Deurs B., Roepstorff K., Hommelgaard A.M., Sandvig K.

"Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean"

*Trends Cell. Biol.* 2003, **13**, 92-100.

Doyle L.A., Yang W., Abruzzo L.V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A.K., Ross D.D.

"A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells"

*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998, **95**, 15665-70.

Drab M., Verkade P., Elger M., Kasper M., Lohn M., Lauterbach B., Menne J., Lindschau C., Mende F., Luft F.C., Schedl A., Haller H., Kurzchalia T.V.

"Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice"

*Science* 2001, **293**, 2449-52.

Drevot P., Langlet C., Guo X.J., Bernard A.M., Colard O., Chauvin J.P., Lasserre R., He H.T.

"TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts"

*EMBO J.* 2002, **21**, 1899-908.

Dunphy J.T., Linder M.E.

"Signalling functions of protein palmitoylation"

*Biochim. Biophys. Acta.* 1998, **1436**, 245-61.

- Dwyer D.S., Pinkofsky H.B., Liu Y., Bradley R.J.  
"Antipsychotic drugs affect glucose uptake and the expression of glucose transporters in PC12 cells"  
*Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 1999, **23**, 69-80.
- Eisenblatter T., Galla H.J.  
"A new multidrug resistance protein at the blood-brain barrier"  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, **293**, 1273-8.
- Eisenblatter T., Hüwel S., Galla H.J.  
"Characterisation of the brain multidrug resistance protein (BMDP/ABCG2/BCRP) expressed at the blood-brain barrier"  
*Brain Res.* 2003, **971**, 221-31.
- Ennis, S.R., Ren, X.D., Betz, A.L.  
"Mechanism of sodium transport at the blood-brain barrier studied with in situ perfusion of rat brain"  
*J. Neurochem.* 1996, **66**, 756-63.
- Eytan G.D., Regev R., Oren G., Assaraf Y.G.  
"The role of passive transbilayer drug movement in multidrug resistance and its modulation"  
*J. Biol. Chem.* 1996, **271**, 12897-902.
- Falguieres T., Mallard F., Baron C., Hanau D., Lingwood C., Goud B., Salamero J., Johannes L.  
"Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes"  
*Mol. Biol. Cell.* 2001, **12**, 2453-68.
- Farrell C.L., Pardridge W.M.  
"Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrically distributed on brain capillary endothelial lumenal and ablumenal membranes: an electron microscopic immunogold study"  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1991, **88**, 5779-83.
- Fellner S., Bauer B., Miller D.S., Schaffrik M., Fankhanel M., Spruss T., Bernhardt G., Graeff C., Farber L., Gschaidmeier H., Buschauer A., Fricker G.  
"Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo"  
*J. Clin. Invest.* 2002, **110**, 1309-18.
- Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M.  
"Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules"  
*Science* 1989, **246**, 64-71.
- Fenn J.B., Rosell J., Nohmi T., Shen S., Banks Jr. F.J.  
"Electrospray Ion Formation: Desorption Versus Desertion in Biochemical and Biotechnical Application of Electrospray Ionization Mass Spectrometry"  
A. Peter Snyder (Hrsg.), American Chemical Society, Washington, DC 1995.
- Feron O., Smith T.W., Michel T., Kelly R.A.  
"Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes"  
*J. Biol. Chem.* 1997, **272**, 17744-8.

Fielding C.J., Fielding P.E.

"Relationship between cholesterol trafficking and signaling in rafts and caveolae"  
*Biochim. Biophys. Acta.* 2003, **1610**, 219-28.

Fra A.M., Williamson E., Simons K., Parton R.G.

"De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin"  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1995, **92**, 8655-9.

Frank M.H., Denton M.D., Alexander S.I., Khoury S.J., Sayegh M.H., Briscoe D.M.

"Specific MDR1 P-glycoprotein blockade inhibits human alloimmune T cell activation in vitro"  
*J. Immunol.* 2001, **166**, 2451-9.

Frey, A., Meckelein, B., Weiler-Güttler, H., Möckel, B., Flach, R., Gassen H.G.

"Pericytes of the brain microvasculature express  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase"  
*Eur. J. Biochem.* 1991, **202**, 421-429.

Foster L.J., De Hoog C.L., Mann M.

"Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors"  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2003, **100**, 5813-8.

Fox I.H., Kelley W.N.

"The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells"  
*Annu. Rev. Biochem.* 1978, **47**, 655-86.

Garcia-Cardena G., Martasek P., Masters B.S., Skidd P.M., Couet J., Li S., Lisanti M.P., Sessa W.C.

"Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo"  
*J. Biol. Chem.* 1997, **272**, 25437-40.

Gatlin C.L., Kleemann G.R., Hays L.G., Link A.J., Yates J.R. 3rd.

"Protein identification at the low femtomole level from silver-stained gels using a new fritless electrospray interface for liquid chromatography-microspray and nanospray mass spectrometry"  
*Anal. Biochem.* 1998, **263**, 93-101.

Gerhart, D.Z., Enerson, B.E., Zhdankina, O.Y., Leino, R.L., Drewes, L.R.

"Expression of monocarboxylate transporter MCT1 by brain endothelium and glia in adult and suckling rats"  
*Am. J. Physiol.* 1997, **273**, E207-E213.

Ghandour, M.S., Langley, O.K., Varga, V.

"Immunohistological localisation of gamma-glutamyltranspeptidase in cerebellum at light and electron microscope levels"  
*Neurosci. Lett.* 1980, **20**, 125-29.

Glynn S.L., Yazdanian M.

"In vitro blood-brain barrier permeability of nevirapine compared to other HIV antiretroviral agents"  
*J. Pharm. Sci.* 1998, **87**, 306-10.

Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., Weiss, W.

"The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients"

*Electrophoresis* 2000, **21**, 1037-53.

Golden P.L., Pardridge W.M.

"P-Glycoprotein on astrocyte foot processes of unfixed isolated human brain capillaries"

*Brain Res.* 1999, **819**, 143-6.

Golden P.L., Pollack G.M.

"Blood-brain barrier efflux transport"

*J. Pharm. Sci.* 2003, **92**, 1739-53.

Goldstein, G.W., Wolinsky, J.S., Csejtei, J., Diamond, I.

"Isolation of metabolically active capillaries from rat brain"

*J. Neurochem.* 1975, **25**, 715-7.

Gottesman M.M., Pastan I.

"Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter"

*Annu. Rev. Biochem.* 1993, **62**, 385-427.

Gygi S.P., Rist B., Gerber S.A., Turecek F., Gelb M.H., Aebersold R.

"Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags"

*Nat. Biotechnol.* 1999, **17**, 994-9.

Gygi S.P., Rist B., Griffin T.J., Eng J., Aebersold R.

"Proteome analysis of low-abundance proteins using multidimensional chromatography and isotope-coded affinity tags"

*J. Proteome. Res.* 2002, **1**, 47-54.

Harlowe, Lane in:

"Antibodies - A laboratory manual"

Cold Spring Harbour; New York, 1988.

Hartinger J., Stenius K., Hogemann D., Jahn R.

"Benzyltrimethyl-n-hexadecylammonium chloride

16-BAC/SDS-PAGE: a two-dimensional gel electrophoresis system suitable for the separation of integral membrane proteins"

*Anal. Biochem.* 1996, **240**, 126-33.

Haspel H.C., Stephenson K.N., Davies-Hill T., El-Barbary A., Lobo J.F., Croxen R.L., Mougrabi W., Koehler-Stec E.M., Fenstermacher J.D., Simpson I.A.

"Effects of barbiturates on facilitative glucose transporters are pharmacologically specific and isoform selective"

*J. Membr. Biol.* 1999, **169**, 45-53.

Higgins C.F., Gottesman M.M.

"Is the multidrug transporter a flippase? "

*Trends Biochem. Sci.* 1992, **17**, 18-21.

Hiran C., Cooray C.A., Colin G., Blackmore L. M., Barrand M.A.

"Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain"

*Neurorep.* 2002, **13**, 2059-63.

Huai-Yun H., Secrest D.T., Mark K.S., Carney D., Brandquist C., Elmquist W.F., Miller D.W.

"Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in brain microvessel endothelial cells"

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, **243**, 816-20.

Idriss H.T., Hannun Y.A., Boulpaep E., Basavappa S.

"Regulation of volume-activated chloride channels by P-glycoprotein: phosphorylation has the final say! "

*J. Physiol.* 2000, **524**, 629-36.

Ilangumaran S., Arni S., van Echten-Deckert G., Borisch B., Hoessli D.C.

"Microdomain-dependent regulation of Lck and Fyn protein-tyrosine kinases in T lymphocyte plasma membranes"

*Mol. Biol. Cell.* 1999, **10**, 891-905.

James D.E., Strube M., Mueckler M.

"Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter"

*Nature* 1989, **338**, 83-7.

Johnstone R.W., Ruefli A.A., Smyth M.J.

"Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein?"

*Trends Biochem. Sci.* 2000, **25**, 1-6.

Jonker J.W., Buitelaar M., Wagenaar E., Van Der Valk M.A., Scheffer G.L., Scheper R.J., Plosch T., Kuipers F., Elferink R.P., Rosing H., Beijnen J.H., Schinkel A.H.

"The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria"

*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2002, **99**, 15649-54.

Joó F.

"The blood-brain barrier in vitro: ten years of research on microvessels isolated from the brain"

*Neurochem. Int.* 1985, **7**, 625-36.

Karas M., Hillenkamp F.

"Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons"

*Anal. Chem.* 1988, **60**, 2299-301.

Klein I., Sarkadi B., Varadi A.

"An inventory of the human ABC proteins"

*Biochim. Biophys. Acta.* 1999, **1461**, 237-62.

Klepper J., Voit T.

"Facilitated glucose transporter protein type 1 (GLUT1) deficiency syndrome: impaired glucose transport into brain- a review"

*Eur. J. Pediatr.* 2002, **161**, 295-304.

Ko Y.H., Pedersen P.L.

"Cystic fibrosis: a brief look at some highlights of a decade of research focused on elucidating and correcting the molecular basis of the disease"

*J. Bioenerg. Biomembr.* 2001, **33**, 513-21.

Krause, D., Kunz, J., Dermietzel, R.

"Cerebral pericytes – a second line of defense in controlling blood-brain barrier peptide metabolism"

*Adv. Exp. Med. Biol.* 1992, **331**, 149-152.

Krause E., Wenschuh H., Jungblut P.R.

"The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins"

*Anal. Chem.* 1999, **71**, 4160-5.

Kruger R., Pfenninger A., Fournier I., Gluckmann M., Karas M.

"Analyte incorporation and ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization visualized by pH indicator molecular probes"

*Anal. Chem.* 2001, **73**, 5812-21.

Kumagai A.K.

"Glucose transport in brain and retina: implications in the management and complications of diabetes"

*Diabetes Metab. Res. Rev.* 1999, **15**, 261-73.

Kurzchalia T.V., Dupree P., Monier S.

"VIP21-Caveolin, a protein of the trans-Golgi network and caveolae"

*FEBS Lett.* 1994, **346**, 88-91.

Kusuhara H., Sugiyama Y.

"Efflux transport systems for drugs at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier (Part 1) "

*Drug Discov. Today.* 2001, **6**, 150-6.

Kusuhara H., Sugiyama Y.

"Efflux transport systems for drugs at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier (Part 2)"

*Drug Discov. Today.* 2001, **6**, 206-12.

Kyhse-Andersen J.

"Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose"

*J. Biochem. Biophys. Methods.* 1984, **10**, 203-9.

Laemmli U.K.

"Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4"

*Nature* 1970, **227**, 680-685.

Lai E.C.

"Lipid rafts make for slippery platforms"

*J. Cell. Biol.* 2003, **162**, 365-70.

Lavie Y., Fiucci G., Liscovitch M.

"Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells"

*J. Biol. Chem.* 1998, **273**, 32380-3.

Le P.U., Guay G., Altschuler Y., Nabi I.R.

"Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum"

*J. Biol. Chem.* 2002, **277**, 3371-9.



Link A.J., Eng J., Schieltz D.M., Carmack E., Mize G.I., Morris D.R., Garvik B.M., Yates J.R. III.

“Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry”  
*Nat. Biotechnol.* 1999, **17**, 676-82.

Liu B., Marks J.D.

“Applying phage antibodies to proteomics: selecting single chain Fv antibodies to antigens blotted on nitrocellulose”  
*Anal. Biochem.* 2000, **286**, 119-28.

Liu J., Wang X.B., Park D.S., Lisanti M.P.

“Caveolin-1 expression enhances endothelial capillary tubule formation”  
*J. Biol. Chem.* 2002, **277**, 10661-8.

Liu N.Q., Lossinsky A.S., Popik W., Li X., Gujuluva C., Kriederman B., Roberts J., Pushkarsky T., Bukrinsky M., Witte M., Weinand M., Fiala M.

“Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway”  
*J. Virol.* 2002, **76**, 6689-700.

Liu P., Ying Y., Anderson R.G.

“Platelet-derived growth factor activates mitogen-activated protein kinase in isolated caveolae”  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1997, **94**, 13666-70.

Liu Q., Vera J.C., Peng H., Golde D.W.

“The predicted ATP-binding domains in the hexose transporter GLUT1 critically affect transporter activity”  
*Biochemistry* 2001, **40**, 7874-81.

Machleidt T., Li W.P., Liu P., Anderson R.G.

“Multiple domains in caveolin-1 control its intracellular traffic”  
*J. Cell. Biol.* 2000, **148**, 17-28.

Mahfoud R., Garmy N., Maresca M., Yahi N., Puigserver A., Fantini J.

“Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins”  
*J. Biol. Chem.* 2002, **277**, 11292-6.

Mann M.

“A shortcut to interesting human genes: peptide sequence tags, expressed-sequence tags and computers”  
*Trends Biochem. Sci.* 1996, **21**, 494-5

Mann M., Hendrickson R.C., Pandey A.

“Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry”  
*Annu. Rev. Biochem.* 2001, **70**, 437-73.

Martin S.E., Shabanowitz J., Hunt D.F., Marto J.A.

“Subfemtomole MS and MS/MS peptide sequence analysis using nano-HPLC micro-ESI fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry”  
*Anal. Chem.* 2000, **72**, 4266-74.

- McCall A.L., Van Bueren A.M., Nipper V., Moholt-Siebert M., Downes H., Lessov N.  
"Forebrain ischemia increases GLUT1 protein in brain microvessels and parenchyma"  
*J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 1996, **16**, 69-76.
- Medzihradszky K.F., Campbell JM, Baldwin MA, Falick AM, Juhasz P, Vestal ML, Burlingame AL.  
"The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI- TOF/TOF tandem mass spectrometer"  
*Anal. Chem.* 2000, **72**, 552-8.
- Meyer J., Mischeck U., Veyhl M., Henzel K., Galla H.J.  
"Blood-brain barrier characteristic enzymatic properties in cultured brain capillary endothelial cells"  
*Brain Res.* 1990, **514**, 305-9.
- Miller, D.W., Keller, B.T., Borchardt, R.T.  
"Identification and distribution of insulin receptors on cultured bovine brain microvessel endothelial cells: possible function in insulin processing in the blood-brain barrier"  
*J. Cell Physiol.* 1994, **161**, 333-41.
- Moffett S., Brown D.A., Linder M.E.  
"Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts"  
*J. Biol. Chem.* 2000, **275**, 2191-8.
- Moyer S.C., Cotter R.J.  
"Atmospheric pressure MALDI"  
*Anal. Chem.* 2002, **74**, 468A-76A.
- Mueckler M.  
"Facilitative glucose transporters"  
*Eur. J. Biochem.* 1994, **219**, 713-25.
- Mueckler M., Caruso C., Baldwin S.A., Panico M., Blench I., Morris H.R., Allard W.J., Lienhard G.E., Lodish H.F.  
"Sequence and structure of a human glucose transporter"  
*Science* 1985, **229**, 941-5.
- Munchbach M., Quadroni M., Miotto G., James P.  
"Quantitation and facilitated de novo sequencing of proteins by isotopic N-terminal labeling of peptides with a fragmentation-directing moiety"  
*Anal. Chem.* 2000, **72**, 4047-57.
- Munn A.L.  
"Molecular requirements for the internalisation step of endocytosis: insights from yeast"  
*Biochim. Biophys. Acta.* 2001, **1535**, 236-57.
- Murata M., Peranen J., Schreiner R., Wieland F., Kurzchalia T.V., Simons K.  
"VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein"  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1995, **92**, 10339-43.
- Nebi T., Pestonjamasp K.N., Leszyk J.D., Crowley J.L., Oh S. W.  
"Proteomic Analysis of a Detergent-resistant Membrane Skeleton from Neutrophil Plasma Membranes"  
*J. Biol. Chem.* 2002, **277**, 43399-409.

Neubauer G., King A., Rappsilber J., Calvio C., Watson M., Ajuh P., Sleeman J., Lamond A., Mann M.

"Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex"

*Nat. Genet.* 1998, **20**, 46-50.

Orlowski M., Meister, A.

"The  $\gamma$ -Glutamyl-cycle: A possible Transport System for Amino Acids"

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1970, **67**, 1248-1255.

Palade G.E,

"the fine structure of blood capillaries"

*J. Appl. Phys.* 1953, **24**, 1424.

Pandey, A., Mann, M.

"Proteomics to study genes and genomes"

*Nature* 2000, **405**, 837-846.

Pardridge W.M.

"Brain metabolism: a perspective from the blood-brain barrier"

*Physiol. Rev.* 1983, **63**, 1481-535.

Pardridge W.M., Boado R.J., Farrell C.R.

"Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization"

*J. Biol. Chem.* 1990, **265**, 18035-40.

Parat M.O., Fox P.L.

"Palmitoylation of caveolin-1 in endothelial cells is post-translational but irreversible"

*J. Biol. Chem.* 2001, **276**, 15776-82.

Parton R.G., Joggerst B., Simons K..

"Regulated internalization of caveolae"

*J. Cell. Biol.* 1994, **127**, 1199-215.

Patel B.N., Dunn R.J., David S.

"Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in mammalian brain"

*J. Biol. Chem.* 2000, **275**, 4305-10.

Pelkmans L., Kartenbeck J., Helenius A.

"Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER"

*Nat. Cell. Biol.* 2001, **3**, 473-83.

Pike L.J.

"Lipid rafts: bringing order to chaos"

*J. Lipid. Res.* 2003, **44**, 655-67.

Pini A., Viti F., Santucci A., Carnemolla B., Zardi L., Neri P., Neri D.

"Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel"

*J. Biol. Chem.* 1998, **273**, 21769-76.

- Predescu S.A., Predescu D.N., Palade G.E.  
"Endothelial transcytotic machinery involves supramolecular protein-lipid complexes"  
*Mol. Biol. Cell.* 2001, **12**, 1019-33.
- Raghu G., Park S.W., Roninson I.B., Mechetner E.B.  
"Monoclonal antibodies against P-glycoprotein, an MDR1 gene product, inhibit interleukin-2 release from PHA-activated lymphocytes"  
*Exp. Hematol.* 1996, **24**, 1258-64.
- Razani B., Combs T.P., Wang X.B., Frank P.G., Park D.S., Russell R.G., Li M., Tang B., Jelicks L.A., Scherer P.E., Lisanti M.P.  
"Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities"  
*J. Biol. Chem.* 2002, **277**, 8635-47.
- Raviv Y., Pollard H.B., Bruggemann E.P., Pastan I., Gottesman M.M.  
"Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells"  
*J. Biol. Chem.* 1990, **265**, 3975-80.
- Resh M.D.  
"Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins"  
*Biochim. Biophys. Acta.* 1999, **1451**, 1-16.
- Regev R., Eytan G.D.  
"Flip-flop of doxorubicin across erythrocyte and lipid membranes"  
*Biochem. Pharmacol.* 1997, **54**, 1151-8.
- Régina A., Morchoisne S., Borson N.D., McCall A.L., Drewes L.R., Roux F.  
"Factor(s) released by glucose-deprived astrocytes enhance glucose transporter expression and activity in rat brain endothelial cells"  
*Biochim. Biophys. Acta.* 2001, **1540**, 233-42.
- Risau W., Esser S., Engelhardt B.  
"Differentiation of blood-brain barrier endothelial cells"  
*Pathol. Biol. (Paris).* 1998, **46**, 171-5.
- Romijn E.P., Krijgsveld J., Heck A.J.R.  
"Recent liquid chromatographic-(tandem) mass spectrometric applications in proteomics"  
*J. Chromatography (A)* 2003, **1000**, 589-608.
- Rondot S., Koch J., Breitling F., Dübel S.  
"A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display"  
*Nat. Biotechnol.* 2001, **19**, 75-8.
- Roper K., Corbeil D., Huttner W.B.  
"Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid microdomains in the apical plasma membrane"  
*Nat. Cell. Biol.* 2000, **2**, 582-92.
- Rothberg K.G., Heuser J.E., Donzell W.C., Ying Y.S., Glenney J.R., Anderson R.G.  
"Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats"  
*Cell* 1992, **68**, 673-82.

Rubin L.L., Hall D.E., Porter S., Barbu K., Cannon C., Horner H.C., Janatpour M., Liaw C.W., Manning K., Morales J.,  
"A cell culture model of the blood-brain barrier"  
*J. Cell. Biol.* 1991, **115**, 1725-35.

Ruetz S., Gros P.  
"Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the *mdr2* gene"  
*Cell* 1994, **77**, 1071-81.

Sanchez del Pino M.M., Hawkins R.A., Peterson D.R.  
"Neutral Amino Acids Transport Characterization of Isolated Luminal and Abluminal Membranes of the Blood-Brain Barrier"  
*J. Biol. Chem.* 1992, **270**, 14913-8.

Sanchez del Pino M.M., Hawkins R.A., Peterson D.R.  
"Biochemical Discrimination between Luminal and Abluminal Enzyme and Transport Activities of the Blood-Brain Barrier"  
*J. Biol. Chem.* 1995, **270**, 14907-12.

Sargiacomo M., Scherer P.E., Tang Z., Kubler E., Song K.S., Sanders M.C., Lisanti M.P.  
"Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization"  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1995, **92**, 9407-11.

Sauna Z.E., Smith M.M., Muller M., Kerr K.M., Ambudkar S.V.  
"The mechanism of action of multidrug-resistance-linked P-glycoprotein"  
*J. Bioenerg. Biomembr.* 2001, **33**, 481-91.

Schermann J.M.,  
"Drug delivery to brain via the blood-brain barrier"  
*Vascular pharmacology* 2002, **38**, 349-54.

Schinkel A.H.  
"P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier"  
*Adv. Drug. Deliv. Rev.* 1999, **36**, 179-94.

Schnabel M., Marlovits S., Eckhoff G., Fichtel I., Gotzen L., Ve´csei V., Schlegel J.  
"Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture"  
*Osteoart. Cartil.* 2002, **10**, 62-70.

Schubert W., Frank P.G., Razani B., Park D.S., Chow C.W., Lisanti M.P.  
"Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo"  
*J. Biol. Chem.* 2001, **276**, 48619-22.

Scott J.K., Smith G.P.  
"Searching for peptide ligands with an epitope library"  
*Science* 1990, **249**, 386-90.

Sekine T., Cha S.H., Endou H.  
"The multispecific organic anion transporter (OAT) family"  
*Pflugers. Arch.* 2000, **440**, 337-50.

Seno K., Kishimoto M., Abe M., Higuchi Y., Mieda M., Owada Y., Yoshiyama W., Liu H., Hayashi F.

"Light- and guanosine 5'-3-O-(thio)triphosphate-sensitive localization of a G protein and its effector on detergent-resistant membrane rafts in rod photoreceptor outer segments".

*J. Biol. Chem.* 2001, **276**, 20813-6.

Shin J.S., Gao Z., Abraham S.N.

"Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells"

*Science* 2000, **289**, 785-8.

Stan R.V.

"Structure and function of endothelial caveolae"

*Microsc. Res. Tech.* 2002, **57**, 350-64.

Simionescu M., Simionescu N., Palade G.E.

"Morphometric data on the endothelium of blood capillaries"

*J. Cell. Biol.* 1974, **60**, 128-52.

Simionescu M., Gafencu A., Antohe F.

"Transcytosis of plasma macromolecules in endothelial cells: a cell biological survey"

*Microsc. Res. Tech.* 2002, **57**, 269-88.

Shetty M., Loeb J.N., Vikstrom K., Ismail-Beigi F.

"Rapid activation of GLUT-1 glucose transporter following inhibition of oxidative phosphorylation in clone 9 cells"

*J. Biol. Chem.* 1993, **268**, 17225-32.

Shevchenko, A., Jensen, O., Podtelejnikov, A., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Boucherie, H., Mann, M.

"Linking genome and proteome by mass spectrometry : large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels"

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, **93**, 14440-5.

Shevchenko A., Loboda A., Shevchenko A., Ens W., Standing K.G.

"MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for proteomic research"

*Anal. Chem.* 2000, **72**, 2132-41.

Shevchenko A., Sunyaev S., Loboda A. Shevchenko A., Bork P., Ens W., Standing K.G.

"Charting the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-quadrupole time- of-flight mass spectrometry and BLAST homology searching"

*Anal. Chem.* 2001, **73**, 1917-26.

Simons K., Ikonen E.

"Functional rafts in cell membranes"

*Nature* 1997, **387**, 569-72.

Simons K., Toomre D.

"Lipid rafts and signal transduction"

*Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2000, **1**, 31-9.

- Simpson I.A., Chundu K.R., Davies-Hill T., Honer W.G., Davies P.  
"Decreased concentrations of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in the brains of patients with Alzheimer's disease"  
*Ann. Neurol.* 1994, **35**, 546-51.
- Singer S.J., Nicolson G.L.  
"The fluid mosaic model of the structure of cell membranes"  
*Science* 1972, **175**, 720-31.
- Smart E.J., Ying Y.S., Conrad P.A., Anderson R.G.  
"Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation"  
*J. Cell. Biol.* 1994, **127**, 1185-97.
- Smart E.J., Ying Y., Donzell W.C., Anderson R.G.  
"A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane"  
*J. Biol. Chem.* 1996, **271**, 29427-35.
- Smart E.J., Graf G.A., McNiven M.A., Sessa W.C., Engelman J.A., Scherer P.E., Okamoto T., Lisanti M.P.  
"Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction"  
*Mol. Cell. Biol.* 1999, **19**, 7289-304.
- Smit J.J., Schinkel A.H., Oude Elferink R.P., Groen A.K., Wagenaar E., van Deemter L., Mol C.A., Ottenhoff R., van der Lugt N.M., van Roon M.A.  
"Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease"  
*Cell* 1993, **75**, 451-62.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Malia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C.  
"Measurement of protein using bicinchoninic acid"  
*Anal. Biochem.* 1985, **150**, 76-85.
- Smith G.P.  
"Filamentous fusion Phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface"  
*Science* 1985, **228**, 1315-7.
- Snyder A.P.  
American Chemical Society und Oxford University Press, Washington, DC, 2000. 122-143
- Sparreboom A., van Asperen J., Mayer U., Schinkel A.H., Smit J.W., Meijer D.K., Borst P., Noolijgen W.J., Beijnen J.H., van Tellingen O.  
"Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P- glycoprotein in the intestine"  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1997, **94**, 2031-5.
- Spengler B., Kirsch D., Kaufmann R., Jaeger E.  
"Peptide sequencing by matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry"  
*Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 1992, **6**, 105-8.

Song K.S., Tang Z., Li S., Lisanti M.P.

"Mutational analysis of the properties of caveolin-1. A novel role for the C-terminal domain in mediating homo-typic caveolin-caveolin interactions"  
*J. Biol. Chem.* 1997, **272**, 4398-403.

Tardieu M.

"HIV-1-related central nervous system diseases"  
*Curr. Opin. Neurol.* 1999, **12**, 377-81.

Thiebaut F., Tsuruo T., Hamada H., Gottesman M.M., Pastan I., Willingham M.C.

"Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues"  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1987, **84**, 7735-8.

Thiebaut F., Tsuruo T., Hamada H., Gottesman M.M., Pastan I., Willingham M.C.

"Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein"  
*J. Histochem. Cytochem.* 1989, **37**, 159-64.

Thorens B., Sarkar H.K., Kaback H.R., Lodish H.F.

"Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells"  
*Cell* 1988, **55**, 281-90.

Tsuij A.

"The Blood-Brain Barrier and Drug Delivery to the CNS"  
Bergley, D.J., Bradbury, M.W. and Kreuter, J. (Hrsg.)  
Marcel Dekker Inc.; New York, Basel, 2000.

Urbatsch I.L., al-Shawi M.K., Senior A.E.

"Characterization of the ATPase activity of purified Chinese hamster P-glycoprotein"  
*Biochemistry* 1994, **33**, 7069-76.

Vannucci S.J., Maher F., Simpson I.A.

"Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia"  
*Glia* 1997, **21**, 2-21.

Vazquez-Laslop N., Zheleznova E.E., Markham P.N., Brennan R.G., Neyfakh A.A.

"Recognition of multiple drugs by a single protein: a trivial solution of an old paradox"  
*Biochem. Soc. Trans.* 2000, **28**, 517-20.

Virgintino D., Robertson D., Errede M., Benagiano V., Girolamo F., Maiorano E., Roncali L., Bertossi M.

"Expression of P-Glycoprotein in Human Cerebral Cortex Microvessels"  
*J. Histo. Cyto.* 2002, **50**, 1671-6.

Vorbrodt, A.W.

"Ultrastructural Cytochemistry of Blood-Brain Barrier Endothelia"  
*Prog. Histochem. Cytochem.* 1988, **18**, 1-99.

Weiler-Güttler H., Zinke H., Möckel B., Frey A., Gassen H.G.

cDNA cloning and sequence analysis of the glucose transporter from porcine blood-brain barrier"  
*Biol. Chem. Hoppe Seyler* 1989, **370**, 467-7.



Wolf S., Seehaus B., Minol K., Gassen, H.G.

“Die Blut-Hirn-Schranke: Eine Besonderheit des cerebralen Mikrozirkulationssystems”  
*Naturwissenschaften* 1996, **83**, 302-311.

Yamade E.

“The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse”  
*J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1955, **1**, 445-58.

Yates J.R. 3rd.

“Mass spectrometry. From genomics to proteomics”  
*Trends Genet.* 2000, **16**, 5-8.

Zhang X., Herring C.J., Romano P.R., Szczepanowska J., Brzeska H., Hinnebusch A.G., Qin J.

“Identification of phosphorylation sites in proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis”  
*Anal. Chem.* 1998, **70**, 2050-9.

Zheleznova E.E., Markham P., Edgar R., Bibi E., Neyfakh A.A., Brennan R.G.

“A structure-based mechanism for drug binding by multidrug transporters”  
*Trends Biochem. Sci.* 2000, **25**, 39-43.

## Anhang I

Die identifizierten Proteine in Tabelle I.1 sind nach der Größe geordnet, was nicht immer mit der Lokalisation im Gel bezüglich des Größenmarker entsprach. Insgesamt wurden 168 verschiedene Proteine identifiziert, wobei einzelne Proteine mehrmals im Gel vorkamen. Neben der Lokalisation ist die Zugriffsnummer für die NCBI-Datenbank in der folgenden Tabelle angegeben.

**Tab..I.1:** *Identifizierte Proteine der LR-Fraktion von C6-Zellen; Mitochondrial – im Mitochondrium, plas.mem. ass – an die Plasmamembran assoziiert, rib – ribosomal, ? – unbekannt, kern – im nucleus lokalisiert, transmembran – Plasmamembranprotein mit Transmembrandomänen, cytoskeletal – Bestandteil des Cytoskelets, GPI – GPI-verankertes Protein, golgi – im Golgi-Apparat lok., sons – sonstiges, er – endoplasmatisches Reticulum*

Masse [Da]	Protein	Lokalisation	acc._nr
4005	cytochrome oxidase subunit VIC	mitochondrial	gi 203714
6144	guanine nucleotide binding protein gamma 12 subunit	plas.mem. ass	gi 2582406
10348	AHNAK-related protein	?	gi 17981389
10679	ribosomal protein S3	rib	gi 347527
11230	histone H4	kern	gi 70762
11234	polyubiquitin	cytosol	gi 1050930
12428	Cytochrome c oxidase polypeptide VA	mitochondrial	gi 117097
12532	60S ribosomal protein L35a	rib	gi 3914537
12622	similar to Ras-related protein RAP-1A	plas.mem. ass	gi 20875149
12632	similar to ribosomal protein L30	rib	gi 25071587
12681	cytochrome c oxidase subunit VIa	mitochondrial	gi 55992
13400	similar to ribosomal protein S15a	rib	gi 20851064
13734	ribosomal protein S25	rib	gi 4506707
13767	histone H2B	kern	gi 70716
13952	histone H2A - bovine	kern	gi 70684
14047	histone H2A.5	kern	gi 70686
14084	ribosomal protein L31	rib	gi 1655596
15214	H3.3 like histone MH321	kern	gi 484531
15543	similar to 60S RIBOSOMAL PROTEIN L17	rib	gi 20851268
15672	similar to ribosomal protein L7a	rib	gi 20829517
15752	ribosomal protein L28	rib	gi 1362931
15788	ribosomal protein L27	rib	gi 4506623
15826	ribosomal protein S23	rib	gi 12846275
16435	ribosomal protein S16	rib	gi 4506691
16723	similar to T-cell receptor alpha chain V region	transmembran	gi 20886541
16920	myosin light chain 3	cytoskeletal	gi 18859
17238	similar to 40S ribosomal protein S13	rib	gi 20887059
17244	similar to H3 histone	kern	gi 27658986
17248	60S RIBOSOMAL PROTEIN L26	rib	gi 4506621
17660	similar to ribosomal protein S18	rib	gi 27671346
18480	similar to 60S ribosomal protein L21	rib	gi 20537450

19402	ribosomal protein S11	rib	gi 12836870
19502	cytochrome c oxidase, subunit 4a	mitochondrial	gi 8393180
19652	homolog to ARP2	cytoskeletal	gi 12857620
20201	similar to ribosomal protein L23a	rib	gi 27673619
20468	caveolin	transmembran	gi 284029
20749	ribosomal protein L18a	rib	gi 11415026
20785	transforming protein rap1b	plas.mem. ass	gi 539995
21323	ras-like protein	plas.mem. ass	gi 190875
21457	K-ras oncogene protein	plas.mem. ass	gi 186764
21645	ribosomal protein L18	rib	gi 13592057
22079	peroxiredoxin 1, Chain A	cytoskeletal	gi 6435547
22176	GTP-binding protein rab1B	plas.mem. ass	gi 92339
22578	ribosomal protein S9	rib	gi 14141193
23011	RAB35, member RAS oncogene family	plas.mem. ass	gi 5803135
23324	ribosomal protein L14	rib	gi 12621122
23549	similar to ribosomal protein L13	rib	gi 25020960
23903	ribosomal protein L10	rib	gi 414587
24145	RIKEN cDNA 2310016C16 gene	?	gi 18044310
24190	ribosomal protein S8	rib	gi 4506743
24378	RAB11A, member RAS oncogene family	plas.mem. ass	gi 4758984
24812	ribosomal protein L10a	rib	gi 23491735
25862	gamma-actin	cytoskeletal	gi 178045
26045	cytochrome c oxidase subunit II	mitochondrial	gi 829023
27386	scar protein, ribosomal protein S4	rib	gi 337930
27737	14-3-3 zeta	plas.mem. ass	gi 1526539
28101	14-3-3 protein	plas.mem. ass	gi 108451
28812	Aquaporin-CHIP	transmembran	gi 267413
29786	prohibitin	sons	gi 4505773
29866	ribosomal protein S3a	rib	gi 8394218
30294	similar to ribosomal protein L7	rib	gi 27660180
30397	Similar to voltage-dependent anion channel 2	mitochondrial	gi 13277640
31472	H+-exporting ATPase	transmembran	gi 89602
31774	laminin-binding protein	cytoskeletal	gi 34234
32946	ADP,ATP carrier protein, heart isoform T1	mitochondrial	gi 399011
32960	ADP,ATP carrier protein T2	mitochondrial	gi 86755
33931	homolog to TRICARBOXYLATE T	mitochondrial	gi 20346164
34179	acidic ribosomal protein P0	rib	gi 71138
35869	GAPDH	cytosol	gi 20820032
35935	annexin V=CaBP37 isoform	plas.mem. ass	gi 260138
36190	aldose reductase-like protein	plas.mem. ass	gi 15864567
36248	tubulin beta-2 chain	cytoskeletal	gi 91856
36541	L-lactate dehydrogenase A chain	mitochondrial	gi 126050
37309	G protein beta 2 subunit	plas.mem. ass	gi 984551
37312	T. pallidum predicted coding region TP0878	?	gi 15639863
37369	Guanine nucleotide-binding protein,beta subunit 1	plas.mem. ass	gi 1730213
37543	guanine nucleotide-binding protein, beta-4 subunit	plas.mem. ass	gi 11055998
37788	alpha-actin	cytoskeletal	gi 49864
37846	unnamed protein product	?	gi 26326551
37848	hypothetical protein MGC27952	?	gi 23956396
38109	G protein Gi2 alpha	plas.mem. ass	gi 9489054
38951	annexin II	plas.mem. ass	gi 2143593

38993	aldolase C	cytoskeletal	gi 229506
39161	beta-actin	cytoskeletal	gi 49868
39179	CD14 antigen	GPI	gi 6753332
39235	fructose-bisphosphate aldolase	plas.mem. ass	gi 68186
39770	SRC-CD44s	transmembran	gi 576533
40101	GTP-binding protein G39	plas.mem. ass	gi 359
40445	Guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha-2 subunit	plas.mem. ass	gi 1730229
40496	guanine nucleotide binding, protein, alpha inh. polypep. 3	plas.mem. ass	gi 6980964
41320	RIKEN cDNA 5730456K23	GPI	gi 20865478
41635	actin gamma	cytoskeletal	gi 71625
41786	mutant beta-actin	cytoskeletal	gi 28336
42429	Heat-Shock Cognate 70kd Protein	cytosol	gi 640325
42429	Heat-Shock Cognate 70kd Prot. (44kd Atpase N-Ter.Frag)	cytosol	gi 640325
43633	flotillin 2	plas.mem. ass	gi 6679811
43958	Vacuolar ATP synthase subunit C	sons	gi 137471
44755	RIKEN cDNA 1200015A22	?	gi 21311891
45578	GTP-binding regulatory protein Gs alpha-2 chain	plas.mem. ass	gi 71882
46088	dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycotransf.	er	gi 627424
47484	flotillin 1	plas.mem. ass	gi 6679809
47885	IgM heavy chain constant region	cytosol	gi 2232299
49927	glial fibrillary acidic protein alpha	cytoskeletal	gi 4103877
50095	elongation factor 1-alpha	rib	gi 31092
51382	Hydroxya.-Coe. Aldehyd./3-ketooa.-Coe. A	mitochondrial	gi 19424338
53681	vimentin	cytoskeletal	gi 340219
56644	phospholipase C	plas.mem. ass	gi 303618
57850	Pyruvate kinase, M2 isozyme	cytosol	gi 2506796
59620	similar to chaperonin subunit 7 (eta)	golgi	gi 27712178
59625	chaperonin containing TCP1, subunit 8 (theta)	cytosol	gi 6005727
59633	chaperonin containing TCP1	golgi	gi 24307939
60322	T-complex 1	golgi	gi 6981642
63928	5 nucleotidase	GPI	gi 11024643
65367	lamin C	cytoskeletal	gi 91032
66719	lamin B	sons.	gi 110630
67660	Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)	cytoskeletal	gi 127236
68135	annexin VI	plas.mem. ass	gi 13994159
68225	ATPase, H+ transporting, lysosomal	sons	gi 6680752
68304	ribophorin I	er	gi 6981486
70043	heat shock protein 70	cytosol	gi 5729877
70884	dnaK-type molecular chaperone hsp72-ps1	cytosol	gi 347019
71460	similar to Ras GTPase-activating protein 3	plas.mem. ass	gi 27673973
71973	Protein disulfide isomerase A4 precursor	er	gi 119531
72909	calpain 5	sons.	gi 6680846
74140	lamin A	sons	gi 346883
74946	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), and GPI anc.	transmembran	gi 6755466
75680	neural cell adhesion molecule	transmembran	gi 2181948
75706	serum albumin precursor	cytosol	gi 418694
77002	nucleolin	kern	gi 92559
78037	cadherin 13	transmembran	gi 20302073
78679	unnamed protein product	mitochondrial	gi 26328849
79336	similar to NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa s.u.	mitochondrial	gi 13637608
82557	threonyl-tRNA synthetase; threonine--tRNA ligase	rib	gi 4507367

82608	endoplasmin (94 kDa glucose-regulated protein)	er	gi 6015101
83035	RIKEN cDNA 1300014E15	plas.mem. ass	gi 20824296
83242	heat shock protein 90-beta	cytosol	gi 72222
83242	heat shock protein 90-beta	er	gi 72222
87242	pyrroline-5-carboxylate synth.; glu- g-semialdehyde synth.	mitochondrial	gi 9790061
88266	Integrin beta-1 (Fibronectin receptor beta subunit) (CD29)	transmembran	gi 1708573
89233	transitional endoplasmic reticulum ATPase	er	gi 1174636
92418	tumor rejection antigen gp96; tumor rej. antigen (gp96) 1	er	gi 6755863
92434	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 9	rib	gi 3123230
95249	elongation factor 2	rib	gi 600159
95948	RAS p21 protein activator 3; GAPIII activator 3	plas.mem. ass	gi 7110713
97090	Importin beta-1 subunit	kern	gi 2829480
102896	actinin, alpha 1	cytoskeletal	gi 13591902
104911	actinin alpha 4	cytoskeletal	gi 11230802
105799	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	sons	gi 3914474
106287	sim. to suppr of tumorig.. 15, memb.-anc. glycoprot RECK	transmembran	gi 27715711
113192	Na,K-ATPase alpha-1 subunit	transmembran	gi 205632
116375	oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide)	mitochondrial	gi 20853413
118017	unconventional myosin Myr2 I heavy chain	cytoskeletal	gi 12831209
119802	nuclear myosin I beta	cytoskeletal	gi 11067002
120764	ceruloplasmin	GPI	gi 6978695
123670	GPI-anchored ceruloplasmin	GPI	gi 6970046
124551	voltage-gated calcium channel alpha2/delta subunit	transmembran	gi 1905817
126901	dNA damage binding protein 1	kern	gi 418316
133646	selectin	plasmamemb.	gi 6912390
138206	tripeptidylpeptidase II	sons	gi 13592121
144990	similar to Vinculin	cytoskeletal	gi 27673645
145567	p53 inducible protein	cytosol	gi 24307955
186600	zinc finger 142	kern	gi 14193747
191493	clathrin, heavy polypeptide	plas.mem. ass	gi 4758012
251156	similar to beta-spectrin 2, brain spectrin	cytoskeletal	gi 20910793
280564	filamin	cytoskeletal	gi 1203969
284420	alphaII spectrin	cytoskeletal	gi 1495198
304092	inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor 3	er	gi 6981110
533214	plectin	cytoskeletal	gi 13540714

In der *Lipid raft*-Fraktion von kultivierten Hirnkapillarendothelzellen der Passage 0 wurden 59 Proteine identifiziert. In der folgenden Tabelle sind sie nach der Masse geordnet. Daneben sind die subzelluläre Lokalisation und die Zugriffsnummer für die NCBI-Datenbank angegeben.

**Tab..I.2:** *Identifizierte Proteine der LR-Fraktion von P0-BMEC; Mitochondrial – im Mitochondrium, plas.mem. ass – an die Plasmamembran assoziiert, rib – ribosomal, ? – unbekannt, kern – im nucleus lokalisiert, transmembran – Plasmamembranprotein mit Transmembrandomänen, cytoskeletal – Bestandteil des Cytoskelets, GPI – GPI-verankertes Protein, golgi – im Golgi-Apparat lok., sons – sonstiges, er – endoplasmatisches Reticulum*

Masse [Da]	Protein	Lokalisation	acc._nr
11041	cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1	mitochondrial	gi 6166026
12445	similar to ribosomal protein L9	rib	gi 27688785
15672	similar to ribosomal protein L7a	rib	gi 20829517
16789	myosin catalytic light chain LC17a	cytoskeletal	gi 89245
17744	hypothetical protein FLJ20625	?	gi 8923579
20103	ribosomal protein L11	rib	gi 631361
20468	caveolin	transmembran	gi 284029
20797	transforming protein rap1b	plas.mem. ass	gi 539995
21237	similar to ATPase, vacuolar	transmembran	gi 20901566
21401	Chain A, Structure RacP67	transmembran	gi 11513661
21570	myosin regulatory light chain B	cytoskeletal	gi 112009
21621	ribosomal protein L18	rib	gi 4506607
22558	ribosomal protein S9	rib	gi 1362936
23466	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog	plas.mem. ass	gi 5454028
24050	oncogene TC21	plas.mem. ass	gi 103724
24508	Ras-related protein Rab-11B	plas.mem. ass	gi 12230509
24844	ribosomal protein L10A	rib	gi 23491735
25862	gamma-actin	cytoskeletal	gi 178045
29003	tropomyosin 5	cytoskeletal	gi 111212
29103	protein kinase C inhibitor	transmembran	gi 13928824
29225	ribosomal protein L7; 60S ribosomal protein L7	rib	gi 15431301
30830	Cytochrome B5 Reductase	mitochondrial	gi 999817
31331	F-actin capping protein beta subunit	cytoskeletal	gi 13124696
31580	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	mitochondrial	gi 10720224
31711	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	transmembran	gi 114823
34370	valosin-containing protein ER ATPase	er membran	gi 11095436
35129	Carbonic anhydrase IV precursor	GPI	gi 5915863
37353	guanine nucleotide-binding protein, beta-1 subunit	plas.mem. ass	gi 6680045
37815	chromosome 8 open reading frame 2	?	gi 6005721
38652	annexin A2; calpactin I heavy chain	plas.mem. ass	gi 6996913
38852	ATP synthase alpha chain	mitochondrial	gi 114511
39556	tropomodulin 3	cytoskeletal	gi 6934244
41633	flotillin 2	plas.mem. ass	gi 12835861
41786	mutant beta-actin	cytoskeletal	gi 28336
42024	alpha 1 actin precursor	cytoskeletal	gi 4501881
43927	polymerase I and transcript release factor	kern	gi 6679567

44586	guanine nucleotide-binding protein alpha subunit	plas.mem. ass	gi 386748
44831	hypothetical protein	?	gi 12053327
47426	elongation factor-1 alpha	rib	gi 1220311
47470	Flotillin-1	plas.mem. ass	gi 13124118
48946	lipoamide succinylt. Comp. of 2-oxoglutarate dehydr.	mitochondrial	gi 18203301
49710	tubulin beta chain	cytoskeletal	gi 109431
50151	alpha tubulin, copy 1	cytoskeletal	gi 304530
52702	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	mitochondrial	gi 27807137
53619	vimentin	cytoskeletal	gi 2119204
53881	Hyal2 protein	GPI	gi 18699094
53949	glucose transport protein GT1	transmembran	gi 109889
56481	H <sup>+</sup> -exporting ATPase	transmembran	gi 543056
57269	alkaline phosphatase	GPI	gi 178462
57969	heat shock protein 58	?	gi 2642332
68220	ATPase	transmembran	gi 291868
72345	brain multidrug resistance protein	transmembran	gi 21530795
84723	Gelsolin precursor	cytoskeletal	gi 121118
99736	major vault protein	transmembran	gi 1362855
184891	beta-spectrin 2, brain spectrin	cytoskeletal	gi 7106421
191493	clathrin heavy chain	Plasmamembr.	gi 4758012
226392	myosin heavy chain nonmuscle form A	cytoskeletal	gi 625305
226602	alpha II spectrin	cytoskeletal	gi 1805280
256808	ATP-binding cassette transporter family A member 12	transmembran	gi 14189735

Aus der Passage 2 wurden nach der Isolierung der *Lipid rafts* und ihrer gelelektrophoretischen Trennung 40 Proteine identifiziert. Die Proteine sind in der nachstehenden Tabelle nach der Größe geordnet. Daneben sind noch die Lokalisation und Zugriffsnummer auf die NCBI-Datenbank angegeben.

**Tab..I.3:** *Identifizierte Proteine der LR-Fraktion von P2-BMEC; Mitochondrial – im Mitochondrium, plas.mem. ass – an die Plasmamembran assoziiert, rib – ribosomal, ? – unbekannt, kern – im nucleus lokalisiert, transmembran – Plasmamembranprotein mit Transmembrandomänen, cytoskeletal – Bestandteil des Cytoskelets, GPI – GPI-verankertes Protein, golgi – im Golgi-Apparat lok., sons – sonstiges, er – endoplasmatisches Reticulum*

Masse [Da]	Protein	Lokalisation	acc._nr
17218	17kD fetal brain protein	?	gi 11641247
20468	caveolin	transmembran	gi 284029
28437	FLJ00144 protein	?	gi 18676494
30830	Cytochrome B5 Reductase	mitochondrial	gi 999817

31711	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	transmembran	gi 114823
33699	protein F	outer membran	gi 347155
37815	chromosome 8 open reading frame 2	?	gi 6005721
38069	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	mitochondrial	gi 10720224
38652	annexin A2; calpactin I heavy chain	plas.mem. ass	gi 4757756
38852	ATP synthase alpha chain	transmembran	gi 114511
39655	complement component C3	transmembran	gi 12649541
41633	flotillin 2	plas.mem. ass	gi 6679811
41786	mutant beta-actin	cytoskeletal	gi 27480676
43475	leucine-zipper protein FKSG13	kern	gi 11034809
43927	polymerase I and transcript release factor	kern	gi 6679567
44586	guanine nucleotide-binding protein alpha subunit	plas.mem. ass	gi 386748
44831	hypothetical protein	?	gi 12053327
47426	elongation factor-1 alpha	rib	gi 1220311
47470	Flotillin-1	plas.mem. ass	gi 13124118
49710	tubulin beta chain	cytoskeletal	gi 109431
50151	alpha tubulin, copy 1	cytoskeletal	gi 11065757
50738	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase	mitochondrial	gi 92350
52702	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	mitochondrial	gi 27807137
53619	vimentin	cytoskeletal	gi 2119204
53949	glucose transport protein GT1	transmembran	gi 109889
54195	Hyal2 protein	GPI	gi 18699096
56481	H <sup>+</sup> -exporting ATPase	transmembran	gi 543056
57269	alkaline phosphatase	GPI	gi 178462
63270	5'-nucleotidase	GPI	gi 539794
68220	ATPase	transmembran	gi 291868
68652	ribophorin I	er-membran	gi 9857227
70854	Heat shock cognate protein 70	cytosol	gi 13242237
72345	brain multidrug resistance protein	transmembran	gi 21530795
84723	Gelsolin precursor	cytoskeletal	gi 121118
108796	Aminopeptidase N	transmembran	gi 1703286
161617	CD109	GPI	gi 19424130
191493	clathrin heavy chain	Plasmamembr.	gi 4758012
226602	myosin heavy chain nonmuscle form A	cytoskeletal	gi 625305
233906	similar to Myosin heavy chain, nonmuscle type B	cytoskeletal	gi 27731537
250774	beta-spectrin 2, brain spectrin	cytoskeletal	gi 7106421



## Anhang II

DNA- und Aminosäure-Sequenz des gegen die *Lipid raft*-Fraktion der kultivierten Hirnkapillarendothelzellen der Passage 0 selektionierten Antikörpers, wobei die durch randomisierte Primer variierten Aminosäuren grau markiert sind.

```
ATGCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTACC 90
TACCGGCTCCACGTCGACAACCTCAGACCCCTCCGAACCATGTCGGACCCCCAGGGACTCTGAGAGGACACGTCGGAGACCTAAGTGG
Met Ala Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr

TTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGGAGTGCAGGTACCACA 180
AAATCGTCGATACGGTACTCGACCCAGGCGGTCCGAGGTCCCTTCCCCGACCTCACCCAGAGTCGATAATCACCTCACGTCCATGGTGT
Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Ala Gly Thr Thr

TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCACCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCC 270
ATGATGCGTCTGAGGCACCTCCCGGCCAAGTGGTGGAGGTCTCTGTAAAGTTCTTGTCGCACATAGACGTTTACTTGTGCGACTCTCGG
Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Thr Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala

GAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAATTGGCGGATTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGTGGCGAT 360
CTCCTGTGCCGGCATATAATGACACGCTTTTAAACCGCTAAAACTGATGACCCCGGTCCCTTGGGACCAGTGGCAGAGCTCACCGCTA
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asn Trp Arg Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Asp

GGGTCCAGTGGCGGTAGCGGGGCGCTCGACTTTCTTCTGAGCTGACTCAGGACCTGCTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGG 450
CCCAGGTACCGCCATCGCCCCGCGAGCTGAAAGAAGACTCGACTGAGTCTGGGACGACACAGACACCGGAACCTGTCTGTCTCAGTCC
Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Arg Leu Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg

ATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTGTACTTGTCTATCTATGGT 540
TAGTGTACGGTTCTCTGTCTGGAGTCTTCGATAATACGTTTCACCATGGTCTGCTCTCGGTCTGTCCGGGGACATGAACAGTAGATACCA
Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly

AAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCG 630
TTTTTGTGGCCGGGAGTCCCTAGGGTCTGGCTAAGAGACCAGGTTCGAGTCTTTGTGTCGAAGGAAGTGGTAGTGACCCCGAGTCCGC
Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala

GAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACCTCCCGGACAGCAGTGGTTATCGGCCGGTATTCGGCCAAGGACCAAGGTGGAATCAAAGC 719
CTTCTACTCCGACTGATAATGACATTGAGGGCCCTGTCGTCACCAATAGCCGGCCATAAGCCGGTTCCTTGGTTCCACCTTTAGTTTCG
Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Tyr Arg Pro Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala
```

## Anhang III

Tab. III.1: Sequenz des brain multidrug resistance proteins (BMRP): Schwarze Sequenzabschnitte - identifizierte Peptide dar (s. Tab. III.2); unterstrichen - vermeintliche Antikörper-Bindestelle (Anit-BXP21), grau unterlegt – ATP-Binderegion; schwarz unterlegt – Caveolin-Binde-Motiv.

MSSNSYQVSIPMSKR <b>NTNGLPGSSSNELK</b> TSAGGAVLSFHDICYRVKVKSGFL	53
FCRKTV <b>KEILT</b> NINGIMKPGLNAILGPTGGGK <b>SSLLDVLAARK</b> DPHGLSGDVL	108
NGAPRPANFKCNSGYVVQDDVVMGTLTVR <b>ENLQFSAAL</b> RLPTTMTNHEKNE	159
<b>RINMVIQELGLDKVADSKVGTQFIR</b> GVSGGERKRTSIAMELITDPSILFLDEPTT	214
GLDSSTANAVLLLLKRMSKQGRTIIFSIIHQPRYSIFKLFDSTLLASGR <b>LMFHGP</b>	269
<b>ARE</b> ALGYFASIGYNCEPYNNPADFFLDVINGDSSAVVLSRADRDEGAQEPEEP	322
PEKDTPLIDKLAIFYTNSSFFK <b>DTKVELDQFSGGR</b> KKKKSSVYKEVTYTTTSFCH	376
<u>QLRWISRRSFKNLLGNPQASVAQIIVTII</u> GLVIGAIFYDLKNDPSGIQNRAGVLFF	433
LTTNQCFSSVSAVELLVVEKKLFIHEYISGYRVSSYFFGKLLSDLLPMRMLPSII	489
FTCITYFLLGLKPAVGSGFFIMMFTLMMVAYSASSMALAIAAGQSVVSVATLLMTI	544
SFVFMIFSGLLVNLKTVVPWLSWLQYFSIPR <b>YGFSALQYNEF</b> LGQNFPCPLN	597
VTTNNTCSFAICTGAEYLENQGISLSAWGLWQNHVALACMMVIFLTIAYLKLLLL	652
KKYS	656

**Tab..III.2:** *Identifizierte Peptide (vgl.. Tab. III.1) mit zugehöriger Masse und Auftreten in der jeweilig isolierten Bande (vgl. Abb. 5.43)*

<b>Peptide</b>	<b>Masse [Da]</b>	<b>In Bande von P0LR</b>
NTNGLPGSSSNEL	1416	12,13,14,15
SSLLDVLAAR	1043	3,4,13,15,16
ENLQFSAAL	1147	3,4,14,30,32
INMVIQELGLDK	1387	15,30,32
INMVIQELGLDKVADSK	1888	6
VGTQFIR	819	4,12,15,16
LMFHGPAR	943	14
DTKVELDQFSGGR	1450	14
VELDQFSGGR	1106	3,12,14

---

## ■ **Lebenslauf**

Name: Stefan Märten  
Geboren am 17.01.1975 in Groß-Gerau  
Familienstand: ledig

### ■ **Schulbildung**

08.81 – 06.85	Grundschule Worfelden
08.85 – 06.87	Carl-von-Ossietzky Schule in Groß-Gerau
08.87 – 06.94	Prälat-Diehl Schule in Groß-Gerau
14.06.94	Abitur

### ■ **Zivildienst**

07.94 – 09.95	Deutsches Rotes Kreuz
---------------	-----------------------

### ■ **Studium**

10.95 – 09.97	Chemie (Diplom) an der Technischen Universität Darmstadt (Grundstudium)
10.97 – 05.00	Hauptstudium Chemie (Diplom) an der Technischen Universität Darmstadt, Schwerpunkt Biochemie
10.98 – 03.99	zwei Trimester in an der <i>Universty of Bristol, Dept. Chemistry/Biochemistry</i> .
07.00 – 01.01	Diplomarbeit mit dem Titel: „Proteomanalyse der Mikrosomenfraktion aus Hirnkapillarendothelzellen zur Identifizierung spezifischer Blut-Hirn-Schranke Proteine“ in Kooperation mit der ESPLORA GmbH unter der Leitung von Prof. Dr. H. G. Gassen

### ■ **Dissertation**

02.01-01-04	Promotionsarbeit mit dem Titel „Proteomanalyse der Blut-Hirn Schranke“ in Kooperation mit der ESPLORA GmbH an der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Prof. Dr. H. G. Gassen.
-------------	---

### ■ **Stipendien**

Preis der Darmstädter Stiftung für Technologietransfer  
Stipendium der Technischen Universität Darmstadt

---

Worfelden den 19.11.03

#### Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Außerdem erkläre ich hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.